

T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇEŞİTLİ KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE BAZI BENZİMİDAZOL  
METAL KOMPLEKS (Zn, Co) BİLEŞİKLERİNİN  
SİTOTOKSİK/APOPTOTİK VE ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Özgür YILMAZ

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA

Eş Danışman: Prof. Dr. Elif APOHAN

HAZİRAN 2021

T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇEŞİTLİ KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE BAZI BENZİMİDAZOL  
METAL KOMPLEKS (Zn, Co) BİLEŞİKLERİNİN  
SİTOTOKSİK/APOPTOTİK VE ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Özgür YILMAZ

Enstitü No : 23612011010

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA

Eş Danışman: Prof. Dr. Elif APOHAN

HAZİRAN 2021

## TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının her aşamasında yardım, öneri, bilgi, tecrübe ve desteklerini esirgmeden beni her konuda yönlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA'ya ve eş danışman hocam Sayın Prof. Dr. Elif APOHAN'a;

İnönü üniversitesi Kimya Bölümünden Prof. Dr. Hasan KÜÇÜKBAY ve Prof. Dr. Ülkü YILMAZ'a ve İnönü Üniversitesi Biyoloji Bölümünden Eray TATLICI'ya;

FDK-2018-1503 no'lu proje ile bu araştırmayı destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimine;

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca beni maddi ve manevi açıdan her zaman destekleyen ve bugüne gelmemi sağlayan değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

## ONUR SÖZÜ

Doktora tezi olarak sunduğum “Çeřitli Kanser Hücreleri Üzerine Bazı Benzimidazol Metal Kompleks (Zn, Co) Bileřiklerinin Sitotoksik/Apoptotik ve Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı dūřecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığına ve yararlandığım bütün kaynakların hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Özgür YILMAZ

## İÇİNDEKİLER

|   |     |
|---|-----|
| TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ.....  | i   |
| ONUR SÖZÜ.....  | ii  |
| İÇİNDEKİLER.....  | iii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ.....  | v   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....  | vi  |
| SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....                              | vii |
| ÖZET.....   | ix  |
| ABSTRACT.....   | x   |
| 1.GİRİŞ.....  | 1   |
| 1.1 Kanser .....  | 2   |
| 1.1.1 Kendi büyüme ve çoğalma sinyallerini üretebilme.....        | 6   |
| 1.1.2 Baskılayıcı hücre bölünme sinyallerine duyarsızlık.....     | 6   |
| 1.1.3 Programlanmış hücre ölümünden kaçış.....                    | 7   |
| 1.1.4 Sürekli bölünebilme yeteneği.....                           | 8   |
| 1.1.5 Anjiyogenez.....  | 9   |
| 1.1.6 Metastaz.....   | 10  |
| 1.1.7 Enerji metabolizmasını yeniden programlama.....             | 10  |
| 1.1.8 İmmün sistemden kaçış.....                                  | 11  |
| 1.2 Kanser Hücre Hatları.....                                     | 12  |
| 1.2.1 A549 hücre hattı (küçük hücre dışı akciğer karsinomu) ..... | 12  |
| 1.2.2 BEAS-2B hücre hattı.....                                    | 13  |
| 1.2.3 Hep3B hücre hattı.....                                      | 13  |
| 1.2.4 HCT116 hücre hattı.....                                     | 14  |
| 1.3 Benzimidazoller.....  | 14  |
| 1.3.1 Benzimidazollerin antimikrobiyal aktiviteleri.....          | 15  |
| 1.3.2 Benzimidazollerin antikanser aktivitesi.....                | 16  |
| 1.4 Hücre Döngüsü ve Kanser.....                                  | 17  |
| 1.5 Apoptoz.....  | 19  |
| 1.5.1 Apoptozun morfolojisi.....                                  | 20  |
| 1.5.2 Apoptotik yolağın biyokimyasal mekanizması.....             | 21  |
| 1.5.2.1 Ekstrinsik apoptoz yolağı.....                            | 22  |
| 1.5.2.2 İntrensik apoptoz yolağı.....                             | 23  |

|  |            |
|--|------------|
| 1.5.3 Apoptozun düzenlenmesi.....  | 24         |
| 1.5.4 Apoptoz ve karsinogenez.....   | 25         |
| 1.5.4.1 Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin dengesinin bozulması.....                               | 25         |
| 1.5.4.2 p53 mutasyonları.....  | 26         |
| 1.5.4.3 Apoptoz inhibitör protein ailesi (IAPs'lar).....   | 26         |
| 1.5.4.4 Azaltılmış kaspaz aktivitesi.....  | 27         |
| 1.5.4.5 Bozulmuş ölüm reseptör sinyali.....  | 27         |
| 1.6 Kaspaz-3 Aktivasyonu.....  | 28         |
| <b>2. KAYNAK ÖZETLER.....</b>  | <b>29</b>  |
| <b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>  | <b>41</b>  |
| 3.1 Tezde Kullanılan Benzimidazol Bileşikleri.....   | 41         |
| 3.2 Hücre Hatları ve Kültür Koşulları.....   | 42         |
| 3.3 Tripan Mavisi Yöntemiyle Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi.....  | 42         |
| 3.4 MTT Yöntemiyle Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi.....  | 43         |
| 3.5 Minimum İnhibe Edici Konsantrasyon (MİK) Yöntemi ile Antimikrobiyal Aktivite Ölçümü.....                 | 44         |
| 3.6 Kaspaz-3 Aktivitesinin Belirlenmesi.....   | 45         |
| 3.7 Western Blotlama ile Protein İfadesinin Belirlenmesi.....  | 46         |
| <b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>   | <b>48</b>  |
| 4.1 Bileşiklerin Hücre Hatları Üzerine Tripan Mavisi Yöntemi İle Belirlenen Sitotoksik Etkileri.....         | 48         |
| 4.2 Bileşiklerin Hücre Hatları Üzerine MTT Yöntemi İle Belirlenen Sitotoksik Etkileri ve IC50 Değerleri..... | 64         |
| 4.3 Bileşiklerin Minimum İnhibe Edici Konsantrasyon Değerleri.....   | 83         |
| 4.4 Bileşiklerin Kaspaz-3 Aktivitesine Etkisi.....   | 84         |
| 4.5 Bileşiklerin Protein İfadeleri Üzerine Etkisi.....   | 90         |
| <b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>   | <b>92</b>  |
| <b>6. KAYNAKLAR.....</b>   | <b>102</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>   | <b>118</b> |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|  |    |
|--|----|
| <b>Çizelge 4.1</b> : Bileşiklerin Hep3B ve HCT116 hücre hatları üzerine 24., 48. ve 72. saat $IC_{50}$ değerleri ( $\mu\text{g/mL}$ )..... | 82 |
| <b>Çizelge 4.2</b> : Bileşiklerin A549 ve BEAS-2B hücre hatları üzerine 24., 48. ve 72. saat $IC_{50}$ değerleri ( $\mu\text{g/mL}$ )..... | 83 |
| <b>Çizelge 4.3</b> : Bileşiklerin MİK değerleri ( $\mu\text{g/mL}$ ).....  | 84 |



## ŞEKİLLER DİZİNİ

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Şekil 1.1  | : 2020 itibari ile tüm kanser vakalarının Dünya’da insidans oranları.....  | 3  |
| Şekil 1.2  | : Türkiye’de erkeklerde (a) ve kadınlarda (b) 2020 yılında yeni kanser vakalarının toplam sayısı ve yüzde dağılımları..... | 4  |
| Şekil 1.3  | : Başlıca kanser belirteçlerini gösteren şema.....   | 5  |
| Şekil 1.4  | : Tümör gelişimde yeni kan damarlarının oluşumunu gösteren şema.....   | 9  |
| Şekil 1.5  | : Warburg etkisini gösteren şema .....   | 11 |
| Şekil 1.6  | : Heterosiklik benzimidazol halka sistemi.....   | 14 |
| Şekil 1.7  | : Benzimidazollerin hücrel sinyalizasyonda bazı hedeflerini gösteren şema....  | 17 |
| Şekil 1.8  | : Hücre döngüsü evrelerini gösteren şema.....  | 18 |
| Şekil 1.9  | : Apoptoz mekanizması.....   | 21 |
| Şekil 1.10 | : Apoptozun düzenlenmesini gösteren şema.....  | 24 |
| Şekil 1.11 | : Apoptozdan kaçış yollarını gösteren şema.....  | 25 |
| Şekil 3.1  | : Çalışmada kullanılan çinko ve kobalt bağlı benzimidazol bileşikleri.....   | 42 |
| Şekil 3.2  | : Tetrazolyum tuzunun formazona dönüşümü.....  | 44 |
| Şekil 4.1  | : Bileşik 1’in A549, BEAS-2B, Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....                                     | 50 |
| Şekil 4.2  | : Bileşik 2’nin Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....   | 51 |
| Şekil 4.3  | : Bileşik 3’ün Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....  | 52 |
| Şekil 4.4  | : Bileşik 4’ün A549, BEAS-2B, Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....                                     | 54 |
| Şekil 4.5  | : Bileşik 5’in A549, BEAS-2B, Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....                                     | 56 |
| Şekil 4.6  | : Bileşik 6’nın A549, BEAS-2B, Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....                                    | 58 |
| Şekil 4.7  | : Bileşik 7’nin Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....   | 59 |
| Şekil 4.8  | : Bileşik 8’in A549, BEAS-2B, Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi .....                                    | 61 |
| Şekil 4.9  | : Bileşik 9’un A549, BEAS-2B, Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine etkisi.....  | 63 |
| Şekil 4.10 | : Sisplatinin A549, BEAS-2B, Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi.....                         | 66 |



|   |    |
|---|----|
| <b>Şekil 4.11:</b> Bileşik 1'in A549, BEAS-2B, Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi .....         | 68 |
| <b>Şekil 4.12:</b> Bileşik 2'nin Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi.....                        | 69 |
| <b>Şekil 4.13:</b> Bileşik 3'ün Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi.....                         | 70 |
| <b>Şekil 4.14:</b> Bileşik 4'ün A549, BEAS-2B, Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi.....          | 72 |
| <b>Şekil 4.15:</b> Bileşik 5'in A549, BEAS-2B, Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi.....          | 74 |
| <b>Şekil 4.16:</b> Bileşik 6'nın A549, BEAS-2B, Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi.....         | 76 |
| <b>Şekil 4.17:</b> Bileşik 7'nin Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi.....                        | 77 |
| <b>Şekil 4.18:</b> Bileşik 8'in A549, BEAS-2B, Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi.....          | 79 |
| <b>Şekil 4.19:</b> Bileşik 9'un A549, BEAS-2B, Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi.....          | 81 |
| <b>Şekil 4.20:</b> Sisplatin uygulanmış A549 ve BEAS-2B hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesinin kontrole göre değişimi (%).....   | 85 |
| <b>Şekil 4.21:</b> Sisplatin uygulanmış Hep3B ve HCT116 hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesinin kontrole göre değişimi .....      | 86 |
| <b>Şekil 4.22:</b> Bileşik 4 uygulanmış Hep3B ve HCT116 hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesinin kontrole göre değişimi (%).....   | 87 |
| <b>Şekil 4.23:</b> Bileşik 6 uygulanmış A549 ve BEAS-2B hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesinin kontrole göre değişimi (%).....   | 88 |
| <b>Şekil 4.24:</b> Bileşik 8 uygulanmış A549 ve BEAS-2B hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesinin kontrole göre değişimi (%).....   | 89 |
| <b>Şekil 4.25:</b> Bileşik 9 uygulanmış Hep3B ve HCT116 hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesinin kontrole göre değişimi (%).....   | 90 |
| <b>Şekil 4.26:</b> Bileşik 4, 6, 8 ve 9 uygulanmış dört hücre hattında $\beta$ -aktin, kaspaz-3 ve p53 protein ifadeleri..... | 91 |

## SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                        |  |
|------------------------|--|
| <b>A549</b>            | : Küçük hücre dışı akciğer karsinomu   |
| <b>APAF-1</b>          | : Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1  |
| <b>ATCC</b>            | : American Type Culture Collection   |
| <b>BEAS-2B</b>         | : Sağlıklı akciğer epitel hücre hattı  |
| <b>CDK</b>             | : Siklin bağımlı kinaz   |
| <b>DMEM</b>            | : Dulbecco's Modified Eagle's Medium   |
| <b>DMSO</b>            | : Dimetil sülfoksit  |
| <b>EGFR</b>            | : Endoteliyal büyüme faktörü   |
| <b>ELISA</b>           | : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay  |
| <b>HCT116</b>          | : Hepatosellüler kolorektal karsinom   |
| <b>Hep3B</b>           | : Hepatosellüler karaciğer karsinom  |
| <b>IAP</b>             | : İnhibitör apoptoz protein ailesi   |
| <b>IC<sub>50</sub></b> | : Hücre proliferasyonunda % 50 azalmaya neden olan konsantrasyon<br>(İnhibisyon konsantrasyonu 50) |
| <b>M</b>               | : Hücre döngüsü mitoz fazı   |
| <b>MİK</b>             | : Minimum inhibe edici konsantrasyon   |
| <b>MTT</b>             | : 3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid                                     |
| <b>p53</b>             | : Tümör supresör gen   |
| <b>PI3K</b>            | : Fosfo-inositol 3 kinaz   |
| <b>PTEN</b>            | : Fosfat tensin homologu   |
| <b>S</b>               | : Hücre döngüsü sentez fazı  |
| <b>TGF</b>             | : Transforme edici büyüme faktörü  |
| <b>TNFR</b>            | : Tümör nekroz faktör  |
| <b>TÜİK</b>            | : Türkiye İstatistik Kurumu  |
| <b>VEGF</b>            | : Vaskular endotel büyüme faktörü (Vascular endotelial growth faktör)                              |
| <b>mA</b>              | : Miliamper  |
| <b>µg</b>              | : Mikro gram   |
| <b>µL</b>              | : Mikro litre  |

## ÖZET

Doktora Tezi

### ÇEŞİTLİ KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE BAZI BENZİMİDAZOL METAL KOMPLEKS (Zn, Co) BİLEŞİKLERİNİN SİTOTOKSİK/APOPTOTİK VE ANTİMİKROBİYAL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Özgür YILMAZ

İnönü Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

119+x sayfa

2021

Danışman: Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA  
Eş Danışman: Prof. Dr. Elif APOHAN

Kanser hastalığı bugün insan hayatını hem manevi hem de maddi olarak olumsuz etkileyen en büyük sağlık sorunu haline gelmiştir. Bu sorunun çözümü için yapılan çalışmalar da bugün için sağlık alanındaki çalışmaların önünde gelmektedir. Bu hastalığın tedavisi için bugün öngörülebilir çözümlerden biri de bu hastalığa karşı etkili ilaç geliştirmektir. Bu amaçla son yıllarda özellikle metal içerikli benzimidazol bileşikler en uygun adaylar arasında görülmektedir.

Bu çalışmada, kobalt ve çinko içerikli dokuz benzimidazol türevi bileşiğin A549 (küçük hücre dışı akciğer karsinomu), BEAS-2B (sağlıklı akciğer epitel hücresi), HCT116 (kolorektal karsinom) ve Hep3B (hepatosellüler karsinom) hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri Tripan mavisi, MTT analizi, Kaspaz-3 aktivitesi ve Western Blotlama ile değerlendirilmiştir. Bütün bileşiklerin sitotoksik etkisi referans bileşik olarak kullanılan sisplatinle karşılaştırılmıştır. Aynı zamanda bileşiklerin antimikrobiyal etkileri de Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan iki bileşiğin (4 ve 9) Hep3B ve HCT116 hücre hatları üzerine güçlü sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bileşik 6 ve 8 A549 hücreleri üzerine sisplatin gibi güçlü sitotoksik etki gösterirken, BEAS-2B hücreleri üzerine ise sisplatininden daha düşük sitotoksik etki göstermiştir. MTT analizi; sisplatin, Bileşik 6 ve Bileşik 8'in A549 hücreleri üzerine 72. saatteki IC<sub>50</sub> değerlerinin sırası ile 4.31, 6.27 ve 4.66 µg/mL olduğunu göstermiştir. Buna karşılık, BEAS-2B hücreleri üzerine 72. saatteki IC<sub>50</sub> değerleri sırası ile 1.78, 54.88 ve 34.34 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Bileşiklerin bakteri ve mayalar üzerinde de yüksek antimikrobiyal etkiye sahip oldukları görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Akciğer kanseri, Antimikrobiyal etki, Benzimidazol kompleks, Karaciğer kanseri, Kolon kanseri, Sitotoksik etki

## ABSTRACT

PhD. Thesis

### INVESTIGATION OF CYTOTOXIC/APOPTOTIC AND ANTIMICROBIAL EFFECTS OF SOME BENZIMIDAZOL METAL COMPLEX (Zn, Co) COMPOUNDS ON VARIOUS CANCER CELLS

Özgür YILMAZ

Inonu University  
Graduate School of Nature and Applied Sciences  
Department of Biology

119+x page

2021

Supervisor: Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA  
Co-supervisor: Prof. Dr. Elif APOHAN

Cancer disease has become the biggest health problem that affects human life both spiritually and financially. The work done to solve this problem is also ahead of the studies in the field of health today. One of the most predictable solutions for the treatment of this disease today is to develop effective drugs against this disease. For this purpose, metal-containing benzimidazole compounds have been seen among the most suitable candidates in recent years.

In this study, the cytotoxic effects of nine benzimidazole-derived compounds containing cobalt and zinc on A549 (non-small cell lung carcinoma), BEAS-2B (healthy lung epithelial cell line), HCT116 (colorectal carcinoma) and Hep3B (hepatocellular carcinoma) cells has been examined using Trypan blue, MTT, Caspase-3 and Western Blotting methods. The cytotoxic effect of all compounds was compared with cisplatin used as reference compound. Their antimicrobial effects were also determined by the Minimum Inhibition Concentration (MIC) method. Two of the compounds used in the study (Compounds 4 and 9) were found to have high cytotoxic effects on Hep3B and HCT116 cells. Compounds 6 and 8 showed a high cytotoxic effect on A549 cells, like cisplatin, but a lower cytotoxic effect on BEAS-2B cells than cisplatin. MTT analysis showed that the  $IC_{50}$  values of cisplatin, Compound 6 and Compound 8 on A549 cells at 72 h were 4.31, 6.27 and 4.66  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , respectively. On the other hand, their  $IC_{50}$  values on BEAS-2B cells at 72 h were determined as 1.78, 54.88 and 34.34  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , respectively. The compounds have also been found to have a high antimicrobial effect on bacteria and yeasts.

**Keywords:** Antimicrobial effect, Benzimidazole compound, Colorectal carcinoma, Cytotoxic effect, Hepatocellular carcinoma, Lung cancer

## 1. GİRİŞ

Canlılığı oluşturan hücrelerin hayat döngüsü hala tam olarak anlaşılamamış bir hikayedir. İlk hücreden evrimleşerek tarih boyunca çok hücreli organizmalara kadar ilerleyen hücresel kökenli değişim ve kurulan denge insanı büyülemektedir. Milyon yıllar süren bu değişim bugün, içinde insanın da olduğu milyonlarca türden oluşan bir hayatın denge içinde oluşmasını sağlamıştır. Bu canlı yaşamı içinde dengeler bozulabilir fakat bozulan denge yerine bir başka denge kurulur. Ancak bu yaşam döngüsünde artık bunun bir istisnası vardır. O da insandır. Maalesef değişim sürecinin en şanslı organizmaları olarak görülen insan gelişmiş düşünsel yeteneklerini bazı alanlarda yanlış kullanabildiği için bugün dünyamızı başta kendisi için olmak üzere hemen hemen her alanda yaşanılmaz bir sürece sokmuştur. Bu süreçlerden birisi de kendi sağlığıdır. Yaşamın olağan akışındaki bazı kontrolsüz ilerlemeler doğal dengede ve insanın kendi vücudundaki dengesinde sorunlar oluşturmaktadır. Oluşan bu sorunların çözümü ise insanlığın en büyük problemlerinden birisi haline gelmiştir.

Bu sorunlardan bugün en başta gelenlerden bir tanesi kanser hastalığıdır. Kanser genetik temeli olan bir hastalıktır. Ancak bu hastalığın gen havuzumuzda birikimi ve bugün başat ve hala hücresel mekanizma boyutunda tam olarak anlaşılamamış bir küresel sorun oluşu daha çok insanın yaşam tarzıyla ilgilidir. Bu sorun artık insanlara başta manevi olmak üzere, maddi olarak da büyük yük getirmektedir. Dünya’da bugün bilimsel olarak en çok çalışılan, emek, zaman ve para olarak insana en çok sorun oluşturan bu hastalığın tedavisi, insan yaşamı için elzem bir konu haline gelmiştir. Bu amaçla birçok farklı yol ve metotlar denenmektedir.

Bu yol ve metotlardan bir tanesi de bu hastalığa karşı etkili ilaç geliştirmektir. Bu alandaki çalışmalar kapsamında özellikle metal içerikli ilaçlar önemli bir umut kaynağı olabilir. Bu tür ilaçlar içerisinde özellikle son yıllarda çok çalışılan benzimidazol bileşiklerin bu hastalığın tedavisinde etkili olabileceği görüşü hakimdir.

Bu tezin amacı kanser hastalığına çözüm olarak kullanılan veya geliştirilmekte olan bedamustin, selumetinib ve galeteron gibi benzimidazol içerikli ilaçlara daha iyi alternatifler sunabilmektir. Bu çalışmada İnönü Üniversitesi Kimya Bölümü’nden Prof. Dr. Hasan Küçükbay tarafından sentezlenmiş olan dokuz farklı benzimidazol bileşiği kullanılmıştır. Bu bileşiklerden 2, 3 ve 7’nin daha önce yapılan çalışmalarda A549 ve BEAS-2B hücreleri üzerine sitotoksik etkisi ve ayrıca mikroorganizmalar üzerine

antimikrobiyal etkisi rapor edilmiştir. Bu nedenle tez çalışmasında, bu üç bileşiğin HCT116 ve Hep3B hücre hatları üzerine etkisi çalışılmıştır. Geriye kalan bileşiklerin ise tüm hücre hatları üzerine sitotoksik etkileri ve ayrıca antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. Dolayısıyla tez çalışması bu açılarından bütünüyle özgünlük taşımaktadır. Bu bileşiklerin A549, BEAS-2B, HCT116 ve Hep3B hücre hatları üzerine sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Tez çalışmasında ayrıca bu bileşiklerin gram negatif *Escherichia coli* (ATCC 25922) ve *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), gram pozitif *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) bakterileri ile *Candida albicans* ve *Candida tropicalis* maya suşları üzerine antimikrobiyal aktiviteleri test edilmiştir.

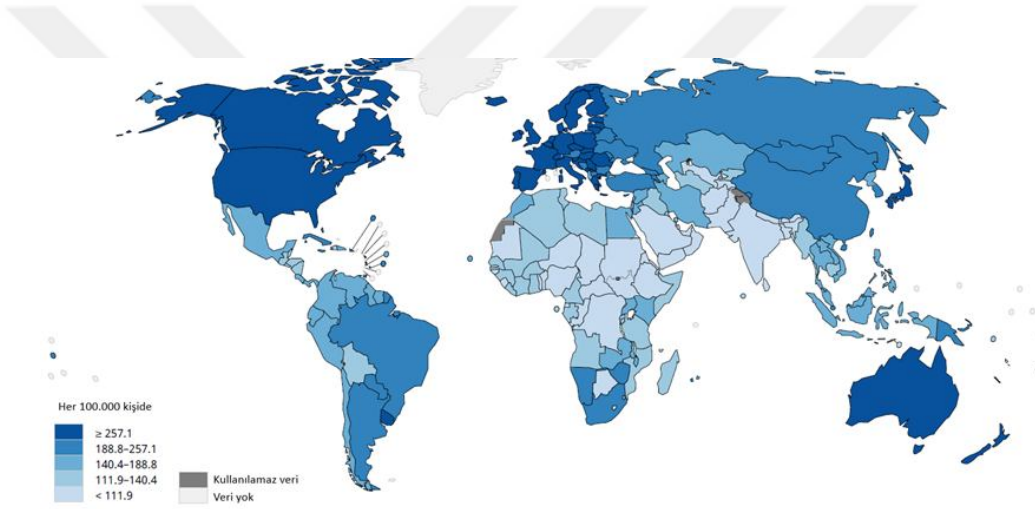
### 1.1. Kanser

Kanser temel olarak genetik bir hastalıktır. Hücrelerimizin çalışma düzenini, nasıl büyüdüklerini ve bölündüklerini kontrol eden genlerde meydana gelen değişiklikler sonucu oluşurlar. Kansere neden olan genetik değişiklikler farklı nedenlerden kaynaklanabilir. Bunlardan birisi aileden miras olarak bireye geçmektedir. Bir diğeri de, hücre bölünmesi sırasında oluşan hatalardan veya çeşitli çevresel koşulların etkisine bağlı olarak oluşan DNA hasarları nedeniyle meydana gelebilir. Bu hatalar ve çevresel koşullar bireyin yaşam sürecinde oluşabilir. Kansere oluşumuna yol açan çevresel koşullar arasında tütün kullanımı, sağlıksız beslenme, alkol kullanımı, güneşten gelen ultraviyole ışınları ve fiziksel hareketsizlik başlıca risk faktörleridir.

Kanser tiplerinin tümünde de, bazı hücreler sürekli bölünür ve diğer dokulara yayılmaya başlarlar. İnsan vücudunun hemen hemen her yerinde kanser oluşabilir ve yayılabilir. Normal koşullarda hücreler, organizmanın ihtiyacı olan yeni hücreleri oluşturmak amacıyla büyür ve çoğalır. Yaşlanma veya vücudun aldığı hasar sonucu hücreler ölür ve bu hücrelerin yerini büyüyen, çoğalan yeni hücreler alır. Ancak bazı durumlarda hücreler anormal hale gelmeye başlar ve yaşlanan ya da hasar görmüş hücrelerin ölmesi gerekirken hayatta kalırlar. Bu hücreler organizma tarafından ihtiyaç duyulmamasına rağmen sürekli olarak bölünür ve çoğalabilirler. Sonunda bu fazla hücreler tümör adı verilen büyümeler oluşturabilir [1].

Dünyadaki ölümlerin önde gelen ikinci ölüm nedeni kanserdir. 2020'de gerçekleşen tahmini 9,9 milyon ölümün nedenidir. 2020'de görülen vaka yaklaşık 19 milyondur. Gerçekleşen her altı ölümden birisinin nedeni kanserdir. Kanserden ölümlerin yaklaşık % 70'i gelişmekte olan ülkelerde olmaktadır (Şekil 1.1). Kansere dolayısıyla oluşan ölümlerin

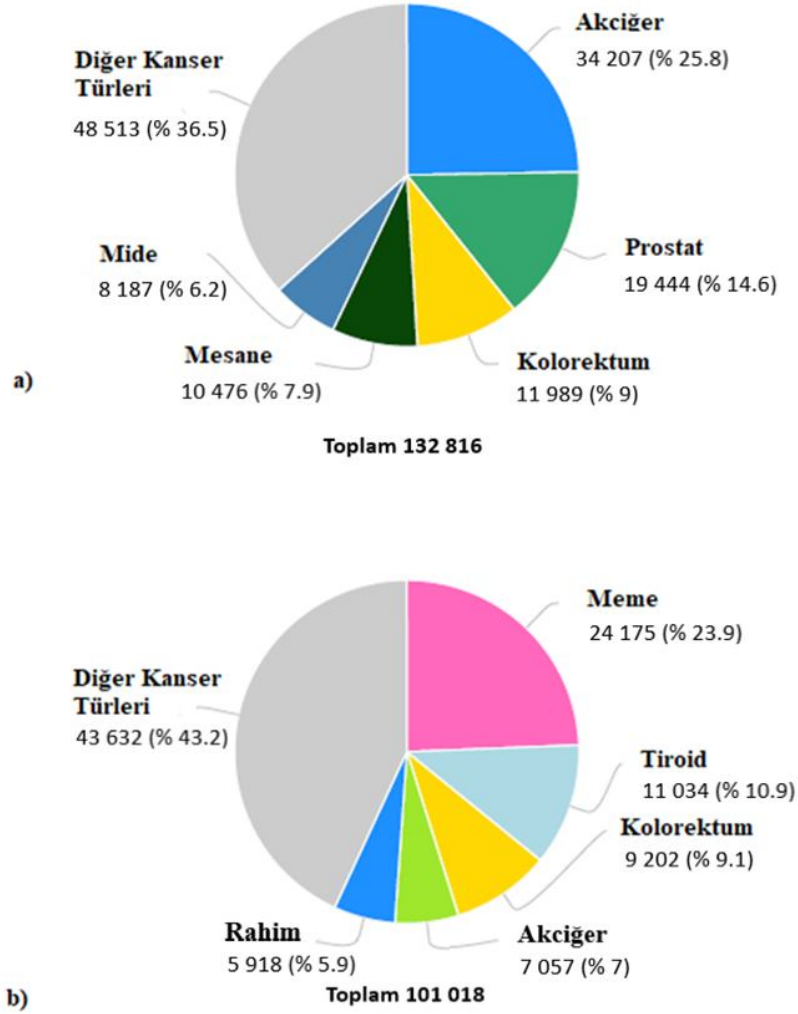
1/3'ü, bazı davranışlardan ve ayrıca diyet riskinden gelişmektedir: Tütün kullanımı, fiziksel aktivite eksikliği, alkol kullanımı, yüksek vücut kitle indeksi, düşük meyve ve sebze alımı risk faktörleridir. Kanser oluşumunda için en önemli risk faktörü tütün kullanımıdır. Tütün kullanımı kansere bağlı ölümlerin yaklaşık % 22'sinden sorumludur. Düşük ve orta gelirli ülkelerde kanser vakalarının % 25'i hepatit ve insan papilloma virüsü (HPV) gibi kansere neden olan enfeksiyonlardan kaynaklanır. 2017 yılında, gelişmekte olan ülkelere yalnızca % 26'sında genel olarak kamu sektöründe patoloji hizmetleri olduğu rapor edilmiştir. Yüksek gelirli ülkelerin % 90'ından fazlası ve düşük gelirli ülkelerin % 30'unun azı tedavi hizmetlerine sahip olduğunu belirtmiştir. Kanserın ekonomik açıdan da etkisi öne çıkmaktadır. 2020 yılında kanserin onkoloji klinik harcamalarının yıllık toplam ekonomik maliyetinin, yaklaşık 167 milyar dolar olduğu düşünülmektedir [2-5].



**Şekil 1.1.** 2020 yılı itibari ile tüm kanser vakalarının Dünya’da insidans oranları [6].

Sağlık Bakanlığı verileri, Türkiye’de her yıl ortalama 163 bin yeni kanser teşhisi konulduğunu göstermektedir. Bu yaklaşık günde 450 yeni kanser vakasına tekabül etmektedir. 2015 yılı verileri, her 100 bin erkekten 247’si ve her 100 bin kadından 177’si yeni kanser vakası olarak kayıtlara geçtiğini göstermektedir. TÜİK verilerine göre Türkiye’de kanser, yıllık ölümlerin yaklaşık % 20’sini oluşturmaktadır. Bakanlık raporlarındaki tahminlere göre 2030 yılında 22 milyon yeni vaka ortaya çıkacaktır. Türkiye’de 2015 yılına ait bakanlık istatistikleri; kadınlarda sırasıyla en sık meme, tiroid, kolorektal, uterus ve akciğer kanserleri, erkeklerde ise akciğer, prostat, kolorektal, mesane ve mide kanserlerinin görüldüğünü ortaya koymaktadır. Dünya Sağlık Örgütü’nün 2020 yılı raporlarında, Türkiye’de görülen yeni kanser vaka sayıları da oldukça düşündürücüdür

(Şekil 1.2). Kadınlarda 4 kanser vakasından birinin meme kanseri olduğu görülmektedir [6-8].



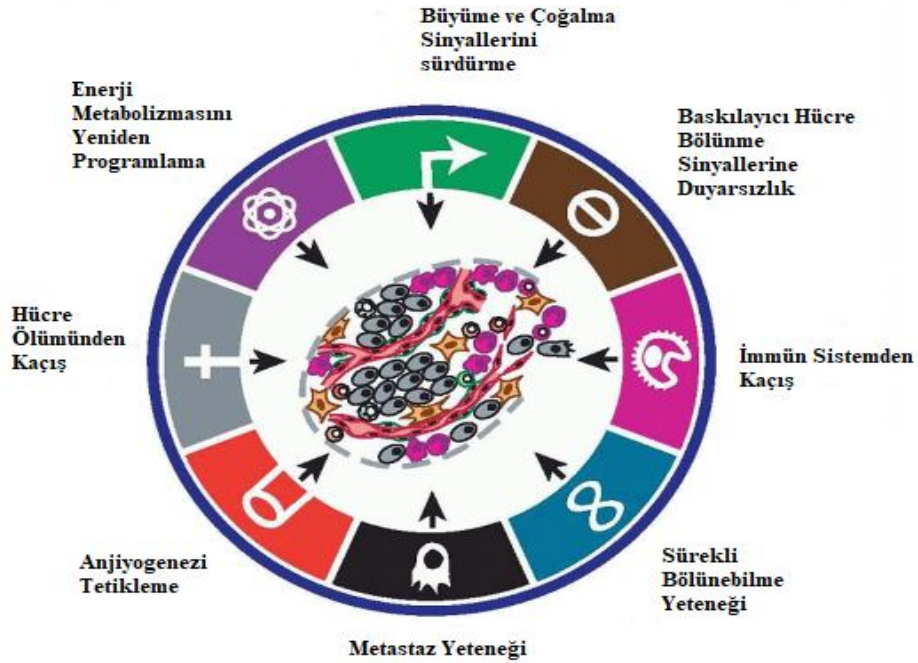
**Şekil 1.2.** Türkiye’de erkeklerde (a) ve kadınlarda (b) 2020 yılında yeni kanser vakalarının toplam sayısı ve yüzde dağılımları [6].

Dünya Kanser Araştırma Fonu’nun yayınladığı verilere göre ülkeler arasında sırasıyla 100 binde yaklaşık 470 kişi ile Avustralya’da, 438 kişi ile Yeni Zelanda’da ve 374 kişi ile de İrlanda’da en çok kanser vakası görülmektedir. Türkiye’deki bu oran 100 binde 144 kişidir [4].

Kanser hücrelerde uzun süreli mutasyonlar ve genetik değişikliklerin birikimi sonucu meydana gelir. Bu süreç içerisinde normal bir hücrenin kanser hücresine evrilmesi uzun ve devamlılık içermesine rağmen bu sürecin daha kolay anlaşılabilmesi için bu süreçteki belli başlı aşamalar bazı araştırmacılar tarafından sınıflandırılmış ve kanser belirtileri (Hallmarks of Cancer) olarak isimlendirilmiştir. İlk defa bu sınıflandırma 2000 yılında



Hanahan ve Weinberg tarafından yapılmıştır [9]. Hanahan ve Weinberg kanserleşme sürecini başlıca altı belirti ile karakterize etmişlerdir. Gerek teknolojik gerek kavramsal gelişmelere bağlı olarak Hanahan ve Weinberg 2011 yılında, altı olan kanser belirteçlerine iki özellik daha ekleyerek sekize çıkarmışlardır (Şekil 1.3) [10]. Bu özelliklerin herbirinin kanserleşme sürecine katkısı olmasına rağmen, her bir ayırt edici özellik her kanser türünde oluşmayabilir. Bu karakteristik özellikler kanserleşme sürecini anlamak adına bize bir çerçeve sunmakta ve kanserin bir dizi genetik değişiklikler yoluyla geliştiğini göstermektedir.



Şekil 1.3. Başlıca kanser belirteçlerini gösteren şema [10].

### **1.1.1. Kendi büyüme ve çoğalma sinyallerini üretebilme**

Hücrelerin büyümesi, çoğalarak dokuları ve organları oluşturup sistemleri meydana getirmeleri karmaşık bir süreçtir. Bu sürecin kontrolü için hücrelerin birbirleri ile uyumlu bir şekilde çalışmaları gerekmektedir. Bu uyumlu çalışma birbirleriyle iletişimi gerektirir. Bu iletişim, Vaskular endotel büyüme faktörü (VEGRF) gibi büyüme faktörleri ile reseptör proteinleri ve kinazlar, fosfatazlar gibi enzimlerin yürüttüğü hücre sinyalizasyonu ile gerçekleştirilir. Kansereleşmiş bir hücre ise bağımsız davranır. Normal bir hücre büyüme ve çoğalma için gerekli sinyali almadığı sürece bölünemez. Ancak kanser hücreleri kendi çoğalmalarını, büyüme sinyalleri üreterek veya aşırı aktif sinyal reseptörlerine sahip olarak büyüme ve çoğalmalarını gerçekleştirirler [11, 12].

Kanser hücreleri, çoğalmayı sağlayacak metabolik süreçleri bir dizi alternatif sinyal yolları ile sürdürürler. Reseptörlerin ekspresyonu yoluyla yanıt verebilecekleri büyüme faktörü ligandlarını üretebilirler. Bu yolla kanser hücreleri, diğer kanser hücrelerine çeşitli büyüme faktörleri sağlayarak tümör gelişimini destekleyebilir ve ilişkili doku içindeki normal hücreleri uyabilirler [11, 13].

Sonuç olarak kanser hücreleri kendi büyüme faktörlerinin ve büyüme faktörü reseptörlerinin miktarlarını kendileri ayarlayarak ve en önemlisi sinyal yolağının akış yolundaki kontrol proteinlerini kapatarak bağımsız bir şekilde büyüme ve çoğalmalarını sağlarlar. Önemli bir örnek, PI3K (fosfatidilinositol 3 kinaza) karşı koyan fosfataz-tensin homologundaki (PTEN) fonksiyon kaybı mutasyonlarıdır. PTEN fosfatazındaki fonksiyon kaybı PI3K sinyal yolağını bozar ve kontrolsüz hücre büyüme ve çoğalmasına sebep olarak tümör oluşumunu teşvik eder [14, 15].

### **1.1.2. Baskılayıcı hücre bölünme sinyallerine duyarsızlık**

Hücre yaşamındaki en önemli aşamalardan bir tanesi hücre döngüsüdür. Hücre döngüsünün her aşaması kontrollü gerçekleşir ve sonunda hücre iki kardeş hücreye bölünür. Bu mekanizmanın sağlıklı işleyebilmesi döngüdeki farklı kontrol mekanizmalarına ve bu mekanizmalarda görevli farklı proteinlere bağlıdır. Hücre çoğalmasını uyaran sinyaller gibi hücre döngüsü sinyal yolağında da hücre büyüme ve çoğalmasını engelleyen sinyaller vardır. Bu çoğalmayı baskılayan faktörler, bir hücrenin sağlıklı ve düzgün çoğalması için döngü mekanizmasının kontrollü gerçekleşmesini sağlarlar. Bir hücre kanser hücrelerine dönüşme sürecine girdiğinde hücre döngüsündeki bu

kontrol proteinleri döngüyü durdurabilir ve gerekirse hücre ölümünü tetikleyebilirler. Bu nedenle bu proteinleri kodlayan genlere aynı zamanda tümör baskılayıcı genler de denilmektedir. Ancak kanserleşme sürecindeki veya kanserleşmiş bir hücre bu tümör baskılayıcı genleri inhibe edebilir veya direk bu genlerdeki mutasyonlardan kaynaklı olarak bir hücre kanserleşme sürecine girebilir. Örneğin, transforme edici büyüme faktör beta (TGF- $\beta$ ) ailesinin üyeleri gibi, hücre büyümesi, canlılığı sürdürme, farklılaşma ve apoptoz gibi hücresel süreçlerde önemli rol oynayan çok işlevli proteinlerdir. Hücre büyüme ve gelişimini baskılayıcı role de sahip olan bu protein ailesinde meydana gelen mutasyonlar kanserleşmeye yol açabilmektedir [16, 17].

Başlıca tümör baskılayıcı proteinlerden bir diğeri ikisi de RB (retinoblastom ile ilişkili) ve TP53 (Tümör protein P53) proteinleridir. RB proteini, hücre içinden ve dışından gelen çeşitli sinyalleri birleştirerek bir yanıt oluşturur. Bu yanıt hücrenin büyüme ve bölünme döngüsü boyunca ilerleyip ilerlemeyeceğini belirler. RB yolağı fonksiyonunda kusur olan kanser hücrelerinde, kontrolsüz ve sürekli bir hücre bölünmesi gerçekleşir. RB, büyük ölçüde hücrenin dışından kaynaklanan büyüme engelleyici sinyalleri dönüştürürken TP53, hücrenin hücre içi sinyal mekanizmasında görev alan stres ve anormallik sensörlerinden veri alır. Genomun hasar derecesi aşırı ise veya nükleotit havuzlarının seviyeleri, büyümeyi teşvik eden sinyaller, glikoz veya oksijenasyon yetersiz ise TP53, bu koşullar normale dönene kadar daha fazla hücre döngüsünün ilerlememesi için durma çağrısı yapabilir. Eğer çok fazla ve onarılamaz bir sorun olduğunda alternatif olarak TP53 apoptozu tetikleyebilir [18-20].

### **1.1.3. Programlanmış hücre ölümünden kaçış**

Hücreler her ne kadar çok iyi savunma ve tamir mekanizmalarına sahip olsa da bazen hücre içerisindeki hataları telafi edemez ve bu durumda hücre kendini tamamen ortadan kaldırmak için apoptoz dediğimiz programlı hücre ölüm yolağına girer. Bu durum hücre yaşlandığında da söz konusudur. Bu, hasarlı DNA'da oluşan hataların vücut içinde yayılmasını önlemek ve bu hataları elimine etmek için hücrelerin geliştirdikleri bir yolaktır. Bu nedenle bu ölüm yolağında görevli proteinleri kodlayan genler de aynı zamanda tümör baskılayıcı genler olarak tanımlanmaktadır. Ancak kanser hücreleri bu normal hücresel ölüm mekanizmasını da engelleyerek çoğalma ve yayılımını sürdürebilmektedir. Tümör baskılayıcı bu genler mutasyonlara veya başka hasarlara maruz kaldıklarında apoptotik sinyal yolağı bozulabilmektedir. Apoptoz sürecinin en önemli

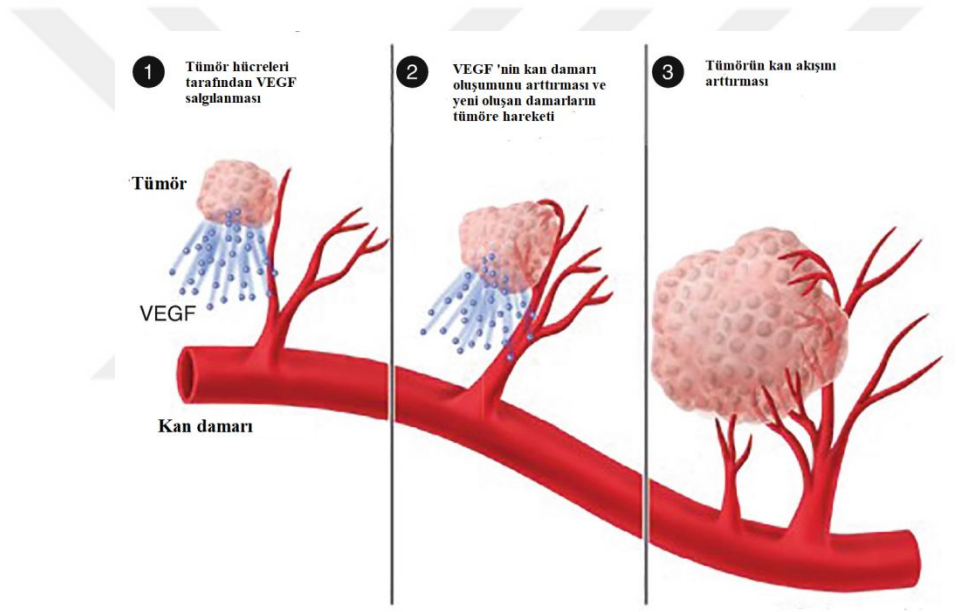
proteinlerinden bir tanesi olan TP53 proteinindeki bir mutasyonun ve bu mutasyon sonucu bu proteinde meydana gelen bir işlev kaybı sonucunda normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesine sebep olabilmesi buna en iyi örneklerden bir tanesidir [21, 22]. Apoptotik sinyal yolağındaki yukarı akış ve aşağı akış efektör bileşenler özellikle kanser tedavi süreçlerinde oldukça ilgi gören hedefler arasındadır. Bu efektörlerin önemli bir sınıfı da ölüm yolağında proteoliz kaskadını başlatmaktan sorumlu bir proteaz ailesi olan kaspazlardır. Başlıca kaspaz-3, -8 ve -9 kanser tedavisinde aktive edilerek kanserleşmiş hücreleri ölüme yönlendirme yoluyla ortadan kaldırılması için çokça çalışılan apoptotik yolak bileşenleridir [23].

#### **1.1.4. Sürekli bölünebilme yeteneği**

Bir tümör oluşumu milyarlarca hücrenin birikimi, kontrolsüz hücre bölünmesi, apoptozdan kaçınma ve sınırsız sayıda replikasyon yapabilme yeteneklerini gerektirmektedir. Vücudumuzdaki çoğu hücre sınırlı sayıda büyüme ve bölünme yeteneğine sahiptir. Belli sayıda bölünmeden sonra hücrelerin büyümesi yavaşlar ve sonunda durur. Bunun nedeni DNA uç kısımlarında bulunan ve DNA'nın korunmasını sağlayan telomer bölgelerinin somatik hücrelerde belli bir bölünme süreci sonunda kısalmasından dolayıdır. Telomeraz enzimi bu telomer yapılarının her replikasyonda yenilenmesini sağlar. Ancak hücrelerde belli bir bölünme sayısından sonra telomeraz enzim aktivasyonunun azalması sonucu DNA'nın telomer bölgesi her hücre döngüsü sonrasında yaklaşık 100 baz çifti kadar kısalır. Bu kısalma kritik seviyeye ulaştığı zaman hücrenin bölünmesi durur. DNA yapısında bozulmalar başlar ve hücre apoptoza giderek ölür. Sağlıklı somatik hücreler bu mekanizma yoluyla replikasyonlarını kendileri sınırlar. Fakat kanser hücrelerinde bulunan telomeraz enziminin aktivasyonu telomerleri koruyabilmekte ve hücrenin süresiz olarak çoğalmaya devam etmelerine sebep olabilmektedir. Kanser hücreleri bu nedenle "Ölümsüzleşmiş" hücreler olarak isimlendirilirler ve % 90'ından fazlası telomerazı aktive edebilir [24].

### 1.1.5. Anjiyogenez

Kanser hücreleri normal hücrelerden daha hızlı çoğalırlar ve sürekli yayılma eğilimindedirler. Kanser hücreleri bu hızlı büyüme ve çoğalmayı gerçekleştirmek için, artan hücre sayısına bağlı olarak ihtiyaç duyulan gerekli oksijen ve besini sağlaması gerekir. Bu gereksinimi de yeni kan damarları aracılığıyla gerçekleştirir. Kanser hücreleri anjiyogenez olarak isimlendirilen bir süreçle yeni kan damarlarının oluşumunu, yeterli besinleri sağlamak ve büyümesini teşvik etmek için uyarabilir. Yeni kan damarları oluşumunda görev alan VEGF ligandlarının gen düzeyinde ifadesi ve düzenlenmesi, kanser hücrelerinde bozulur. Bu ligandların aşırı ifadesi anjiyogeneze ve devamında metastaza sebep olur (Şekil 1.4) [25].



Şekil 1.4. Tümör gelişiminde yeni kan damarlarının oluşumunu gösteren şema [26].

Embriyogenez sırasında, damar sisteminin gelişimi, yeni endotel hücrelerinin doğumunu ve mevcut olanlardan yeni damarların filizlenmesine (anjiyogenez) ek olarak kapiller tüplere birleştirilmesini içerir. Bu morfogenezi takiben, normal damar sistemi büyük ölçüde sabit hale gelir. Anjiyogenez süreci; erişkinlerde yara iyileşmesi ve kadın üreme döngüsü gibi fizyolojik süreçlerin bir parçası olarak geçici bir süre devam eder. Kanserleşme sürecinde ise tümör ilerlemesi sırasında, “anjiyogenik bir anahtar” neredeyse her zaman aktive edilir ve açık kalır, bu da normal olarak hareketsiz, sabit vasküler

sistemde sürekli olarak neoplastik büyümelerin devam ettirilmesine ve yeni damarların filizlenmesine olanak sağlar [27].

#### **1.1.6. Metastaz**

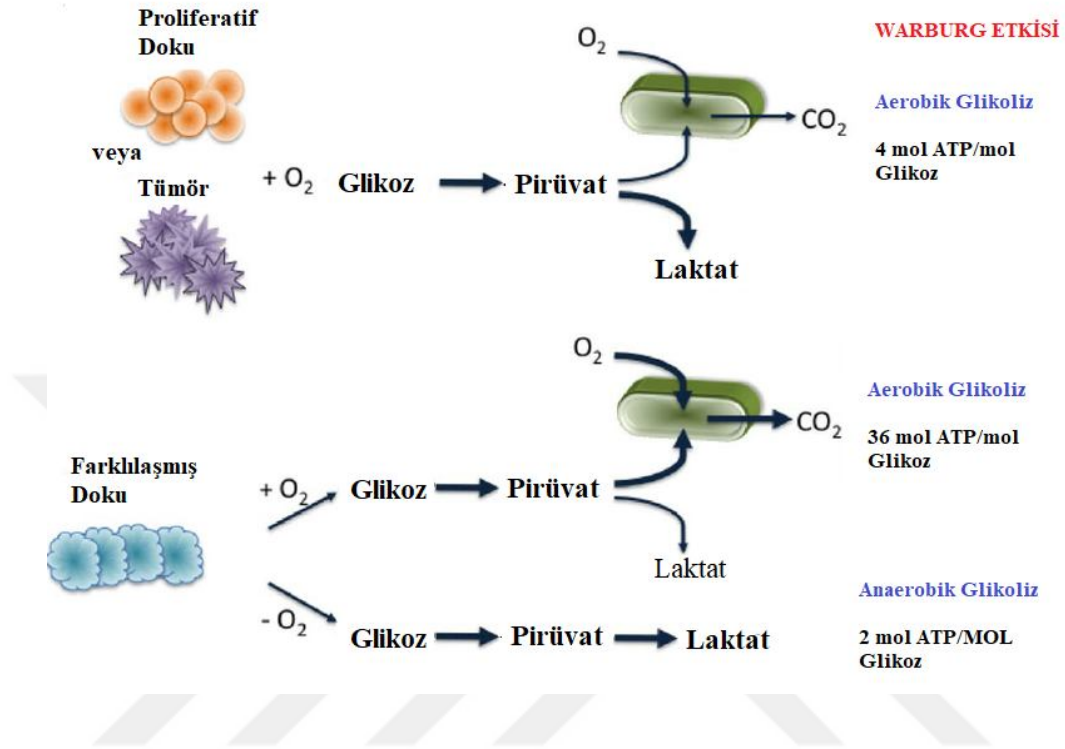
Metastaz kanser hücrelerinin köken aldıkları doku veya organlardan vücudun başka bölgelerinde bulunan organ veya dokulara yayılmasını ifade eder. Bu süreç birbirleriyle ilişkili anjiyogenez, invazyon, extravazasyon ve proliferasyon gibi bir seri olaylar zinciri ile gerçekleşir. Yukarıda anlatıldığı üzere anjiyogenez sonucunda yeni kan damarları oluşur ve kanser hücreleri komşu hücrelerle olan bağlantılarını kopararak primer tümör dokusu olarak isimlendirilen, köken aldıkları dokulardan ayrılırlar. Buradan ekstrasellüler matrikse geçiş yapar ve kan damarları yoluyla uzak bölgelerdeki diğer doku ve organlara geçip bu sistemleri de istila ederler [28].

Metastaz sürecindeki en önemli proteinlerden bir tanesi kadherinlerdir. İntegrinler hücrelerin ekstrasellüler dokuya bağlanmalarını sağlarken kadherinler hücreler arasındaki bağlantıyı oluştururlar. Bu kadherin sınıfı proteinler içinde özellikle E-kadherinler hücreler arasında bir çimento görevi görür. E-kadherinlerle hücrelerin birbirine bağlanması, hücrelerin büyüme sinyallerini de kapatmasını sağlar. Bu şekilde hücreler büyüme ve çoğalmalarını durdururlar. Ancak metastaz yapan kanser hücrelerinde E-kadherinler kusurludur. Bu nedenle bu protein grubunda meydana gelen bozulmalar önemli kanser belirtileri olarak görülmektedir [29, 30].

#### **1.1.7. Enerji metabolizmasını yeniden programlama**

Kanserleşme sürecinin en önemli belirtilerinden olan kronik ve genellikle kontrolsüz hücre çoğalması, hücre çoğalmasının sadece düzensiz kontrolünü değil, aynı zamanda hücre büyümesini ve bölünmesini hızlandırmak için enerji metabolizmasında da bu kontrolün gerekli ayarlamalarının yapılmasını gerektirmektedir. Bilindiği üzere aerobik koşullar altında, normal hücreler glikozu, önce sitozolde glikoliz adı verilen bir süreçle piruvata dönüştürür, daha sonra da mitokondride su ve karbondioksit kadar dönüşüm gerçekleşir. Anaerobik koşullar altında, glikoliz tercih edilir ve oksijen tüketen mitokondrideki sürece nazaran az piruvat elde edilir. İlk olarak Otto Warburg kanser hücrelerinin enerji metabolizmasının anormal bir özelliğe sahip olduklarını gözlemlemiştir. Kanser hücrelerinin önemli bir kısmı oksijen varlığında bile, glikoz metabolizmasını ve

dolayısıyla enerji üretimini sınırlandırarak enerji eldesini büyük ölçüde glikoliz süreciyle sınırlamışlardır. Bu sürece aerobik glikolisiz denilmektedir (Şekil 1.5) [31, 32].



Şekil 1.5. Warburg Etkisini gösteren şema [33].

Mitokondriyal oksidatif fosforilasyona göre sadece glikoliz yolu ile ATP üretmenin nispeten zayıf etkinliği göz önüne alındığında, kanser hücrelerinin neden mitokondriyal yol yerine bu yolu tercih ettikleri ilginç bir durumdur. Farklı yaklaşımlara göre, artan glikoliz, özellikle hücre büyümesi ve bölünmesi için gerekli nükleozitler ve amino asitler gibi glikolitik ara maddelerin daha hızlı ve çok miktarda üretilmelerini sağlar. Bu süreç yeni hücrelerin oluşturulması için gerekli makromoleküllerin ve organellerin biyosentezini kolaylaştırır [34].

### 1.1.8. İmmün sistemden kaçış

Normal koşullar altında vücudun herhangi bir yerinde oluşan kanser hücreleri immün sistem tarafından yok edilmektedir. Zayıf immün tepki durumunda kanser hücreleri bu süreçten kaçabilmektedir. Tümörler, immün tanıma sisteminden farklı yollar ile

kaçınmaktadırlar. Örneğin tümör hücreleri normal hücrelerin oluşturdukları yeni antijenleri ifade etmeyebilirler veya T hücrelerinin aktivasyonunda gerekli bazı uyarıcı moleküllerin ifadesini durdurabilirler. Bazı tümör hücrelerinde ise MHC (Major Histocompatibility Complex Gene Region) antijenin ifadesi yapılmaz. İmmün denetimin yetersiz kalmasının nedenlerinden bazılarıda: bir tümörün erken aşamada gelişmesi, immün sistemi uyarmak için gerekli miktardan daha az antijenin oluşması, bazı regülatör hücreleri indüklemesi (CD4, CD25, FoxP3 ve T hücreler) veya immün sistemden kaçabilen tümör hücrelerinin hızlı çoğalma yeteneğine sahip olması olarak sayılabilir. Ek olarak bazı tümörler kendileri ile etkileşime giren antijenleri ayırarak antikorları engelleme yoluna gidebilirler ve T hücrelerinin tümör hücreleri ile etkileşimini engellerler [35, 36].

## **1.2. Kanser Hücre Hatları**

Kanser yaklaşık 100 kadar farklı türe sahiptir. Kanser hücreleri isimlerini bazen kökenlendikleri organlara göre veya etki ettikleri dokulara göre alırlar. Kökenlendikleri organlara göre; karsinoma, sarkoma, miyeloma, lösemi/lenfoma ve karışık tip kanser tipleri olarak beş sınıfa ayrılırlar. Etki ettikleri organ ve dokulara göre kanser türleri; deri, akciğer, meme, kolon ve serviks kanserleri olarak gruplandırılmaktadırlar.

Bu çalışmada kullanılan kanser hücre hatları A549 (küçük hücre dışı akciğer karsinomu), BEAS-2B (sağlıklı akciğer epitel hücre hattı), Hep3B (hepatosellüler karaciğer karsinoma) ve HCT116 (hepatosellüler kolorektal karsinoma) hücre hatlarıdır.

### **1.2.1. A549 hücre hattı (küçük hücre dışı akciğer karsinomu)**

Küçük hücre dışı akciğer kanseri (KHDAK) dünyadaki kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir ve tüm akciğer kanseri vakalarının yaklaşık % 85'ini oluşturmaktadır. EGFR ve ALK (Anaplastik lenfoma kinaz) gibi belirli tirozin kinaz mutasyonları içermesi özellikle hedefe yönelik tedavi geliştirmek için bu hücre hatları ilaç geliştirme çalışmalarında önemli bir hücre hattıdır. Bununla birlikte, ilaç direncinin ortaya çıkması, biyoteknoloji ve ilaç endüstrisini, bu hastalık için yeni terapötik yaklaşımlar geliştirmek için hala önemli bir baskı altında bırakmaktadır. Günümüzde hem temel araştırma hem de ilaç keşfi için kullanılan çok sayıda küçük hücre dışı akciğer kanseri hücre hattı bulunmaktadır. A549 hücre hattı bir adenokarsinoma insan alveolar epitel



hücreleridir ve ilk defa 1973 yılında 58 yaşındaki bir erkek hastadan izole edilmiştir [37, 38].

### 1.2.2. BEAS-2B hücre hattı

Bronşiyal epitelyal kökeninin genel olarak tanınması nedeniyle BEAS-2B hücre hattı, akciğer karsinogenezi dahil solunum hastalıkları ile ilgili çok çeşitli çalışmalarda *in vitro* hücre modeli olarak yaygın kullanılmaktadır. BEAS-2B hücre dizisi, 1988'de Curtis C. Harris'in grubu tarafından kanserli olmayan bir kişiden elde edilen normal insan bronşiyal epitelinden oluşturulan yaygın olarak kullanılan ölümsüzleştirilmiş ancak tümör dışı bir insan hücre hattıdır. Hücre dizisi, bir adenovirüs 12-SV40 hibrid virüsü ile transfeksiyon ve ardından ardışık hücre geçişi ile ölümsüzleştirme yoluyla kurulmuştur. Bronşiyal epitel hücre hattı olarak etiketlendiğinden BEAS-2B, akciğer karsinogenesinde epitel-mezenkimal geçişin (EMT) rolü dahil olmak üzere akciğer karsinogenesinde yer alan hücresel ve moleküler mekanizmaları incelemek için yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Ek olarak BEAS-2B hücre hattı, potansiyel akciğer toksisitesi veya akciğer kanserojenliği ile çeşitli kimyasalların ve biyolojik ajanların analiz edilmesi veya taranması için *in vitro* hücre modeli olarak kullanılmaktadır [39].

### 1.2.3. Hep3B hücre hattı

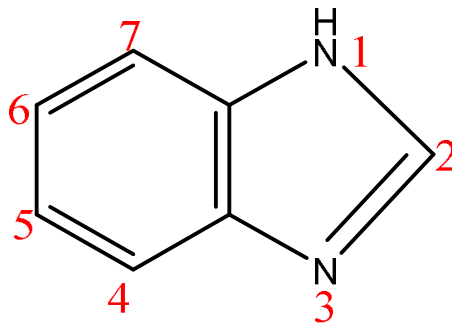
Primer karaciğer kanseri, ağırlıklı olarak hepatoblastoma (HB) ve hepatoselüler karsinom (HCC), dünya çapında ölüm nedeniyle yoğunluk oranında sırasıyla beşinci ve üçüncü sırada olan en yaygın katı tümörlerindedir [40]. Bu özel kanserin *in vitro* çalışmaları için, HepG2 ve Hep3B hücre hatları sıklıkla deneysel model olarak kullanılmaktadır. Çünkü bu hücre hatları iyi karakterize edilen karaciğer kanseri hücre hatlarıdır ve aynı zamanda birçok ortak özelliğe sahiptir. Bu nedenle paralel karşılaştırmalar için uygun hücre hatlarını oluştururlar. Ayrıca bu iki hücre hattı yeni farmasötik ilaçlar geliştirme çalışmalarında, ilgili enzimler hakkında ve ilacın inhibisyonu veya indüksiyon potansiyeli hakkında bilgi dahil olmak üzere ilaç metabolizması ile ilgili bilgi edinmeyi amaçlayan hücre referans modelleridir [41].

#### 1.2.4. HCT116 hücre hattı

Kolorektal kanser, erkeklerde en sık teşhis edilen üçüncü ve dünya çapında kadınlarda en fazla görülen kanserdir ve 2018 yılında Amerikan Kanser Araştırma Enstitüsünün istatistiklerine göre yılda 1,8 milyon vaka görülmektedir [42]. Gelişmekte olan ülkelerde kolorektal kanser görülme sıklığı artmaktadır, bu da kısmen lipit metabolizmasına atfedilmektedir. Kolorektal kanser, 2012 yılında meydana gelen tahmini 693.900 ölümlerle erkeklerde tüm maligniteler arasında dördüncü en ölümcül hastalıktır. HCT116 hücreleri insan kolon karsinomundan türetilir. HCT116 hücreleri KRAS proto-onkogeninin 13. kodonunda bir mutasyona sahiptir ve gen terapisi araştırması için uygun transfeksiyon hedefleridir [43].

#### 1.3. Benzimidazoller

Schiff bazlı metal bileşiklerden olan benzimidazoller biyolojik ve farmakolojik uygulamalarda yıllardan beri oldukça ilgi gören bileşiklerdir. Benzimidazoller bir benzen halkasının bir imidazol halkasına 4. ve 5. pozisyonlarından kaynaşması sonucu oluşan bir birleşik aromatik imidazol halka sistemidir (Şekil 1.6). Benzimidazoller genellikle alkol ortamında primer aminlerle ketonların veya aldehytlerin yoğunlaşma reaksiyonları yoluyla elde edilirler. Sahip oldukları halka sisteminden dolayı çeşitli biyolojik ve klinik uygulamaları nedeniyle birçok biyoaktif heterosiklik bileşikte bulunurlar. Dolayısıyla proteinler, enzimler ve reseptörler gibi biyolojik makromoleküllerle etkileşime girebilirler. Bu benzimidazoller hem asidik hemde bazik karakterlidirler. Benzimidazollerin diğer bir karakteristik özelliği tuz oluşturma kapasitesine sahip olmalarıdır. Aromatik bazlı Schiff bazları, halka yapısıyla serbest elektron delokalizasyonu sonucunda biyolojik uygulamalarda daha fazla potansiyel göstermiştir [44, 45].



Şekil 1.6. Heterosiklik benzimidazol halka sistemi.

Organik moleküllerde bulunan en baskın heteroatomlar esas olarak azot, oksijen ve kükürttür (N, O, S). Azot içeren heterosiklik bileşikler imidazol ve benzimidazol olarak önemli farmakofor sınıfının bir çerçevesini oluşturmaktadır. Astemizol, mebendazol, enviroksim, karbendazim türevleri yaygın olarak kullanıldığı ve ticarileştirildiği için birçok araştırmacının dikkatini çekmiştir. Kaynaşmış heterosiklik halka yapısı, azot bazlarının çekirdeğini oluşturdukları için nükleotitlerin oluşumu için çok önemlidir [46]. Benzimidazol ve türevleri biyopolimerler ile kolayca etkileşime girer ve vitamin B12 türevlerine yapısal benzerliklerinden dolayı biyolojik olarak aktif bileşiklerin geliştirilmesi için etkili potansiyele sahiptirler [47].

### **1.3.1. Benzimidazollerin antimikrobiyal aktiviteleri**

Antibiyotiklerin yaygın kullanımı patojen mikroorganizmaların bu ilaçlara karşı yüksek direnç geliştirmesine sebep olmuş ve mikrobiyal enfeksiyonların tedavisinde önemli bir sorun ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, daha etkili ve daha az toksik yeni moleküllerin bu hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmesi acil bir durum haline almıştır. Bu gereksinim doğrultusunda son yıllarda benzimidazol türevi bileşikler sahip oldukları tedavi edici özelliklerinden dolayı, ilgi çekici ve çalışılan potansiyel ilaçlar olmuşlardır. Heterosiklik bileşikler olan benzimidazoller bu amaçla yüksek derecede yapısal çeşitlilik sunmaktadır [48-50].

Funguslar, bakteriler, parazitler ve virüsler; birçok antimikrobiyal ajanın potansiyelini etkisiz hale getirmeye devam ettikleri için küresel sağlık sorunlarının başında gelmektedirler. Bu mikroorganizmaların prevalansı, uyarlamalar ve mutasyonlar, yeni gelişen ilaçların seçiciliği ve bazı aday ilaçların toksisite etkisi nedeniyle bir endişe oluşturmaktadır. Bu mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlar, tüketicilerin veya organizmaların sağlık durumunu, insan yaşamında ve hayvanlarda kayba yol açabilecek şekilde etkiler. Dolayısıyla bu durum biyoaktif özelliklere sahip yeni bileşiklerin sürekli araştırılmasını teşvik etmektedir [51].

Farklı benzimidazollerin mikroorganizmalar üzerinde etkisi farklı bakteriyel metabolik sistemde görev alan faktörler üzerinde oluşabilir. Bazı benzimidazoller özellikle  $\beta$ -tubulin proteinlere bağlanıp mikrotübül oluşumunu inhibe ederek [52], septum oluşumu ve hücre bölünmesinde görevli FtsZ proteinini inhibe ederek [53], DNA topoizomeras

inhibisyonunu gerçekleştirerek [54,55] ya da bakterilerde biyofilm oluşumunu engelleyerek etkili antimikrobiyal aktivite gösterebilmektedirler [56].

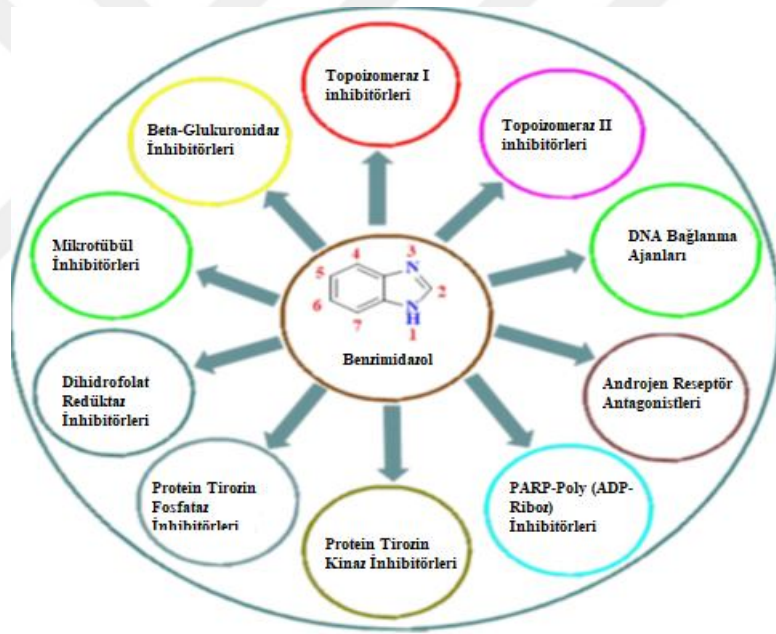
### 1.3.2. Benzimidazollerin antikanser aktivitesi

Antikanser kemoterapötik bir ajan olarak sisplatinin keşfi, potansiyel antikanser ajanlar olarak metallo-ilaçlar alanında önemli gelişmeleri beraberinde getirdi ve araştırmacıları metal içerikli ilaçların keşfine yöneltti. O zamandan beri birçok potansiyel metallo-ilaç keşfedildi ve dünya çapında kliniklerde, sisplatin, oksaliplatin, karboplatin gibimetalo-ilaçlar kanserleri tedavi etmek için kullanıldı. Bununla birlikte kanser hücrelerinin bu ilaçlara karşı artan direncini ve yüksek tedavi maliyetini azaltmak için, potansiyel alternatiflerin tasarlanması ihtiyacı doğmuştur. Klasik olmayan metal bazlı kemoterapötikleri tasarlamak ve geliştirmek için sürekli çaba sarf edilmiştir. Bu nedenle, birçok bilim insanı yeni metal bazlı antikanser maddeleri tasarlamak için dikkatlerini özellikle çinko ve bakır olmak üzere geçiş metallere yoğunlaştırmıştır. Her iki metal iyonu, birçok metallo-proteinin aktif bölgesinde belirgin bir rol oynayan biyo-temel elementlerdir. Bakır redoks sistemleri vücuttaki katalitik sürece dahil olur. Bakır reaktif oksijen türleri (ROS), endojen DNA hasarı ve nükleobaz afinitesi üretir ve bu nedenle proliferatif aktiviteyi destekler. Büyüme ve gelişme için çinko iyonuna ihtiyaç vardır; hücrelerin metabolizmasında önemli bir düzenleyici iyon olup, birkaç antikanser ilaç ile ilişkili kardiyotoksisiteyi ve hepatotoksisiteyi azaltır. Ayrıca bakır ve çinko da protein ve DNA'ya karşı afiniteye sahiptir, ancak bağlanma eğilimleri çoğunlukla organik motiflere bağlıdır. Bu nedenle, organik parçanın/koordineli ligandın rolü de çok önemlidir. Bu bağlamda, benzimidazol kısımları metal merkezleri, düzlemsellik ve proteinlerde imidazol fonksiyonlarını taklit edebildikleri için benzersiz ve ilginçtir. Benzimidazol çekirdeği ayrıca vücutta B12 vitamini bileşeni olarak bulunur. Bir imidazol halkası olan biyolojik olarak aktif farmakoforun varlığı, antihistaminik, antitüberküloz, anti-HIV, antihipertansif ve antikanser gibi geniş biyolojik aktivitelere sahip olmada çok yönlülük sağlar. Bu nedenle benzimidazol türevli parçaların ilaç tasarımına girişi biyolojik aktiviteleri artırabilir [57].

Benzimidazol türevi bileşiklerin antikanser özellikleri hücrenin moleküler mekanizmasında birçok farklı hedefe olan afinitelerinden kaynaklanır. Bu hedefler apoptotik yoldan hücre döngü yolağına, hücre iskeleti oluşumuna kadar birçok hücrenel sinyal yollarında bulunur (Şekil 1.7). Bu özelliği de benzimidazol türevlerinin etkili

antikanser ajanları olarak öne çıkmasını sağlamaktadır. Benzimidazol türevi bileşiklerin kanser hücrelerindeki hedef protein veya protein kompleksleri arasında, tip I-II topoizomerazlar [58, 59], protein tirozin kinazlar [60], mikrotübüller [61], beta glukuronidazlar [62] başlıca sayılabilecek olanlardır.

Benzimidazollerin kanser tedavisinde etkili ilaçlar oluşturabilme potansiyeline sahip olmalarının nedenlerinden biri de çok hedefli (multitarget) ilaç olma potansiyeline sahip olmasından dolayıdır. Bugün tek hedefe yönelik kemoterapotik ilaçlar çok etkili olamamaktadır. Kanser hücreleri bu ilacın etkisinden kurtulabilmekte başka hücre içi sinyal yolları kullanarak büyüme ve çoğalmasını gerçekleştirebilmektedir. Benzimidazollerin heterosiklik halka yapısı hücre içi sinyalizasyonda birden fazla hedef üzerinde etkili ilaçlar geliştirmek için iyi bir potansiyele sahiptir [63].



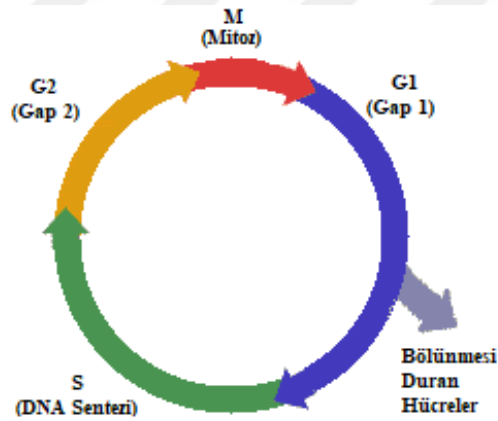
Şekil 1.7. Benzimidazollerin hücre içi sinyalizasyonda bazı hedeflerini gösteren şema [64].

#### 1.4. Hücre Döngüsü ve Kanser

Bir organizmanın doğumundan ölümüne kadar süren yaşam döngüsü içinde bir homeostasi (iç denge) söz konusudur. Bu denge hücre çoğalması, büyümenin durdurulması ve apoptoz dediğimiz hücre ölüm mekanizmaları ile sürdürülür. Bu dengenin bozulması organizmanın normal yaşamsal döngüsünde sorunlara neden olur. Bu dengenin sürdürüldüğü en önemli mekanizmalardan birisi de hücre döngüsüdür. Bu döngüde rol alan

ve proto-onkogen olarak isimlendirilen bileşenlerde meydana gelen mutasyonlar tümör gelişimine, yine bu döngüde görev alan tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen yapısal bozulmalar ise anormal hücre büyümesine ve çoğalmasına neden olur [65, 66].

Hücre bölünmesi, esas olarak DNA replikasyonu ile karakterize iki ardışık süreçten oluşur ve kopyalanmış kromozomların iki ayrı hücreye ayrılmasıyla sonuçlanır. Başlangıçta hücre bölünmesi iki aşamadan oluşur: mitoz (M: nükleer bölünme süreci) ve interfaz (iki M arasındaki süre) (Şekil 1.8). Bu iki mitoz arasında G1, S (sentez) ve G2 fazı bulunur. DNA'nın replike olması, S fazı olarak adlandırılan interfaz aşamasının belirli bir kısmında gerçekleşir. Hücre S fazına girmeden önce DNA sentezine hazırlandığı bir boşluk vardır. Bu boşluğa G1 adı verilir. Bunu takiben hücrenin mitozu hazırlandığı ve G2 olarak isimlendirilen bir boşluk gelir [10]. G1, S, G2 ve M fazları, normal hücre bölünmesinde hücre döngüsünün alt bölümleridir. Hücreler G1'de, DNA replikasyonu başlamadan önce bir dinlenme sürecine girer [65].



**Şekil 1.8.** Hücre döngüsü evrelerini gösteren şema [67].

Kanserleşme sürecinde hücre bölünmesinin genetik kontrolü ve düzenlenmesinde sürekli hücre çoğalması ile sonuçlanan bir dizi değişiklikler oluşur. Mutasyonlar proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelir. Proto-onkogenlerin ürünleri sağlıklı hücrelerde, farklı seviyelerde hücre çoğalmasını indükleyen yollarda görev alırlar. Proto-onkogenlerin mutasyonu sonucu oluşan mutant durumları veya onkogenlerin kendileri tümör büyümesini teşvik edebilir. Tümör baskılayıcı genlerin (P53 gibi) inaktivasyonu, normal koşullar altında hücre döngüsü sürecini engelleyen proteinlerde işlev bozukluğuna sebep olur [68]. Kanserle bağlantılı hücre döngüsündeki bozulma hücre döngüsünün farklı aşamalarında görevli proteinlerdeki mutasyonlarla

birlikte görülür. Kanserde hücre döngüsündeki mutasyonlar genellikle CDK'lar (Siklin bağımlı kinazlar), siklinler, CDK aktive edici enzimler, CDK substratları ve kontrol noktası proteinlerini kodlayan genlerde belirlenmiştir [66, 69].

Siklin D bir büyüme sensörü gibi davranır ve mitojenik uyarılarla hücre döngüsü arasında bir bağlantı sağlar. Siklin D1, G1'in başlarında CDK4 ve CDK6'ya bağlanır. Anormal siklin D1 ifadesi birçok insan kanserinde rapor edilmiştir [70].

CDK'nın aktivasyonu, Cdc25 fosfataz ailesinin üyeleri tarafından fosforilasyon yoluyla düzenlenir. Cdc25A, G1 / S-faz geçişinde önemli bir rol oynar. Cdc25B S-fazı boyunca aktivasyonunu sürdürür ve Cdc25C, CDK1-siklin B'yi mitoz sürecine girene kadar aktive eder. Cdc25'in dereglasyonu veya aşırı ekspresyonu, CDK-siklinlerin beklenmedik aktivasyonuna ve tümör oluşumuna neden olur. Cdc25A ve Cdc25B potansiyel insan onkogenleridir. Meme kanseri vakalarının % 32'sinde Cdc25B'nin aşırı ifade olduğu gözlenmiştir [71].

## 1.5. Apoptoz

Hücre ölümü, özellikle apoptoz, muhtemelen kanser tedavisinde, tedavi amaçlı en çok çalışılan konulardan biridir. Apoptotik yolak hem hastalığın patogeneze dair hem de hastalığın çözümüne dair bilgi de vermektedir. Önceki kısımlarda bahsedildiği gibi kanserde, hücre bölünmesi ile hücre ölümü arasında bir denge kaybı vardır ve ölmesi gereken hücreler, bunun için sinyal almamıştır. Sorun, apoptoz yolu boyunca herhangi bir adımda ortaya çıkabilir. Apoptotik yolakta bir tümör baskılayıcı gen olarak görev alan p53'ün aşağı sinyal yolağında meydana gelen sorunların ve bunun sonucunda p53'ün inaktivasyonunun birçok insan kanser hücre oluşumundan sorumlu olması buna en iyi örnektir [72]. Apoptotik yol kanserdeki başlıca sorunlardan biri olmasının yanında diğer taraftan bu özelliğinden dolayı kanser tedavisinde de bu sorunun çözümünün nedeni olabilir.

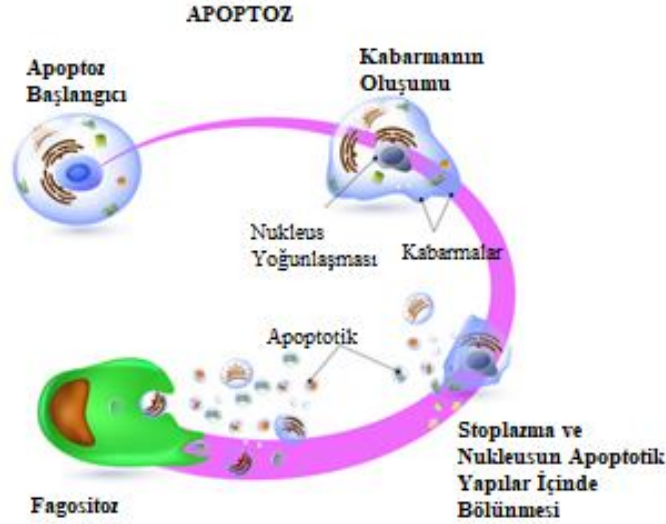
Nekrozdan farklı olarak apoptoz, bir hücrenin belirli kaynaklardan gelen uyarıları aldıktan sonra kendisini ölüme götürdüğü durumu tanımlamaktadır. Apoptoz, 1970'lerde Kerr ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır ve o günden bu zamana kadar başta kanser olmak üzere birçok biyolojik süreçleri için en çok çalışılan metabolik yollardan biridir [73].

### 1.5.1 Apoptozun morfolojisi

Apoptotik yola giren hücrelerde meydana gelen morfolojik değişiklikler genelde bütün hücrelerde benzerdir. Bu morfolojik değişiklikler çekirdek ve sitoplazmada meydana gelen değişiklikler olarak ikiye ayrılabilir. Hücre ölümsürecinin başlaması ve hücrelerin parçalanması arasında yaklaşık birkaç saatlik süre geçer. Ancak bu süre apoptotik uyarılara ve hücre tipine bağlı olarak değişebilir [74].

Apoptozda oluşan biyokimyasal değişimler esas olarak başlıca üç tip değişiklik olarak gözlenebilir: 1) kaspazların aktivasyonu, 2) DNA ve protein parçalanması süreci ve 3) membranda meydana gelen değişiklikler ve hücrelerin makrofajlar tarafından tanınması (Şekil 1.9). Apoptozun başlarında, hücre zarının iç katmanlardan dış katmanlarına geçen fosfatidilserin (PS) ifadesi gerçekleşir. Bu da, makrofajlar tarafından ölü hücrelerin erken tanınmasına izin verir. Bu aşamadan sonra DNA'nın karakteristik olarak 50 ila 300 kilobaz büyük parçalara parçalanması gerçekleşir. Daha sonra, endonükleazlar ile DNA'nın oligonükleozomlara internükleozomal parçalanması 180 ila 200 baz çiftinin katları şeklinde meydana gelir. Bu özellik apoptozun karakteristiği olmasına rağmen, agaroz jel elektroforezinde tipik DNA merdiveni nekrotik hücrelerde de görülebildiği için spesifik değildir. Apoptozun bir diğer önemli süreci kaspaz adı verilen sistein proteaz ailesine ait enzimlerin aktive edilmesidir. "Kaspaz" ın "k" sı, bir sistein proteazına işaret ederken, "aspaz", enzimin aspartik asit kısımlarından parçalanmasına işaret eder. Aktifleştirilmiş kaspaz enzimleri birçok önemli hücresel proteini ayırır ve nükleer iskeleyi ve hücre iskeletini parçalar. Bunun yanısıra, DNA'yı daha da bozan DNAaz'ın aktivasyonunu sağlarlar [75].





**Şekil 1.9.** Apoptoz mekanizması [76].

### 1.5.2. Apoptotik yolağın biyokimyasal mekanizması

Apoptoz bozulmaları ile sonuçlanan durumların patogenezi anlamının ve apoptotik genlerin veya bu apoptotik yolun belli hedefleri için ilaç geliştirebilmenin başlıca yolu bu yolağın mekanizmasını iyi anlamaktan geçer.

Çevreden gelen uyarılarla veya hücrenin kendi döngüsünde oluşan hatalar sonucu oluşan sinyallere bağlı olarak apoptoz başlamaktadır. Hücre dışı uyarılar olarak tümör nekroz faktörü (TNF), koloni uyarıcı faktörler (CSF) nöron büyüme faktörü (NGF) ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) gibi maddelerin hücrenin bulunduğu ortamda miktarlarındaki düşüş gibi uyarılar sayılabilir. Bunların dışında radyasyon, ilaçlar ve çeşitli antijenlerin etkisi de apoptozun başlatılmasında etkilidir. Otoimmün hastalıkların meydana gelmesinde önemli bir yer tutan Fas/FasL ve sFas proteinleri hücreyi apoptozla götürebilmektedir. Bazı virüslerinde (influenza virüsü, adenovirüs vd.) TNF reseptörü üzerinden veya hücrenin genetik yapısını bozarak apoptoz sürecini başlatabilmektedir [77].

Apoptozu başlatan hücre içi uyarılara; sitokinler, TNF, hücre içi kalsiyum miktarında meydana gelen artışlar, genlerde meydana gelen hasar sonucu bir tümör süpresör gen olan p53'ün aktivasyonu, glukokortikoidler ve onkogenler (c-myc gibi) dahildir. Bunun yanısıra sitotoksik antikanser ilaçlar, radyasyon ve hipoksi gibi nekroza sebep olabilen etkenler apoptoz sürecini de başlatabilirler. Apoptoz süreci genel olarak çevresine fazla etki etmeden ilerlese de bazı durumlarda çevre dokularında bulunan

hücrelerde nekroza sebep olabilir. Apoptoz süreci; DNA hasarı sonucu oluşan genlerin yanıtı, ölüm sinyallerinin hücre membranı tarafından alınması (Fas ligandı) ve proteolitik enzimlerin hücreye doğrudan girişi (granzim) olmak üzere üç farklı şekilde gerçekleşebilir. Apoptoz sürecininin temel olarak üç anahtar bileşeni bulunmaktadır. Bu bileşenler; kaspazlar, Bcl-2 ailesi proteinleri ve Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) proteindir. Bu bileşenlerin aktive olması apoptozda gözlenen mitokondriyal hasar, çekirdek zarının parçalanması, DNA'nın fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimlerin şekillenmesi gibi morfolojik değişikliklerin nedendir [78].

Apoptotik hücre ölüm mekanizmasında sinyalizasyon iki temel süreç üzerinden ilerlemektedir. Birinci süreç hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile başlayan ekstrinsik yol, bir diğer ismiyle Fas/Fas-Ligand yolu diğeri ise genellikle stresle tetiklenen ve mitokondrideki değişikliklerle devam eden intrinsik yani mitokondriyal yoldur.

#### **1.5.2.1. Ekstrinsik apoptoz yolağı**

Ekstrinsik ölüm yolağı bazı ölüm reseptörlerinin uygun ligandlara bağlanması aracılığıyla gerçekleşir. Bu yolda şimdiye kadar en iyi anlaşılan süreç Fas/Fas-ligand ekstrinsik ölüm yolağıdır [79]. Hücre ölüm reseptörleri olan Fas ve Tümör Nekroz Faktörün (TNFR-1) FasL ve TRAIL ligandları ile etkileşime girmesi sonucu ekstrinsik apoptoz yolağı indüklenir. Hücre yüzeyinde bulunan bu membran reseptörleri, TNFR (Tümör Nekroz Faktör) protein ailesinin üyesidirler. Fas ve TNFR-1 proteinleri, ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı alınmış olur ve bir seri protein-protein etkileşimine girerler. Daha sonra TRADD (TNFR-1 associated death domain) ve FADD (Fas-associated death domain) ile etkileşime girerek DISC (Death-inducing signaling complex) kompleksini oluştururlar. DISC kompleksi içinde inaktif prokaspazın aktif kaspaz-8'e dönüşümü gerçekleştirilir. Bu dönüşüm kaspaz kaskadı dediğimiz süreci aktive eder. Bunun sonucunda meydana gelen biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler iki yolla apoptozun indüksiyonu gerçekleşir. Bunlardan birincisi hücre yüzey reseptörlerine ölüm indükleyici ligandların bağlanması yoluyla gerçekleşir. İkincisi ise sitotoksik T lenfositlerle apoptozisin indüksiyonu sağlanmış olur [80].

### 1.5.2.2. İntinsik apoptoz yolağı

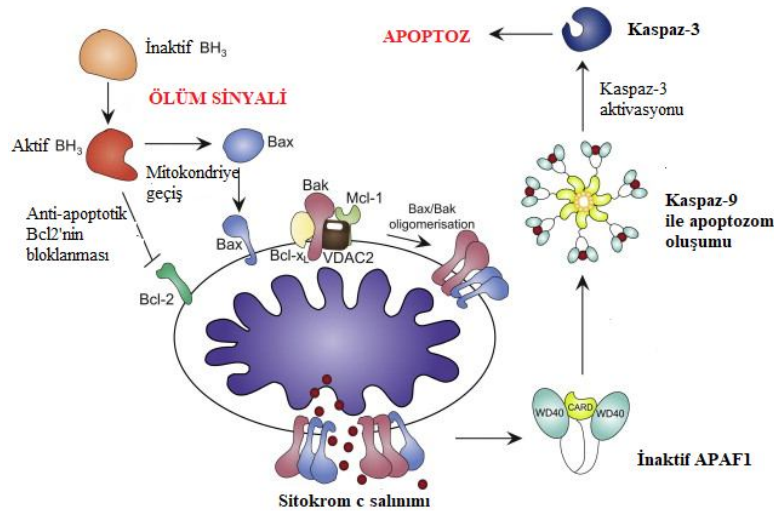
Bazı durumlarda apoptoz süreci hücrel streslen sonra açığa çıkan intrinsik sinyaller ile başlatılabilmektedir. Hücrel stres farklı nedenlerle oluşmaktadır. Viral enfeksiyonlar, hipoksi, radyasyon, kimyasallar gibi etkenlerle oluşabildiği gibi büyüme faktörlerindeki noksanlık ya da oksidatif stresin oluşması durumlarında da hücrel stres meydana gelebilir. İntinsik sinyaller apoptozu iki yolla tetikler. Bunlardan bir tanesi mitokondriyal intrinsik yolak, diğeri de endoplazmik retikulum yolağıdır. Endoplazmik retikulum yolağı halen çok fazla aydınlatılamamıştır. Bu yolda hipoksi, serbest radikaller ve açlık gibi hücrel stresler sonucu hücrede protein sentezinde bir azalma meydana gelir ve bu durum bir adaptör protein olarak bilinen TNF reseptör bağlantılı faktör 2 (TRAF2) proteini prokaspaz-12'den ayırır ve prokaspaz-12 aktif hale geçerek apoptozu tetikler [81]. Mitokondri organeli aracılığıyla gerçekleşen intrinsik yolda ise hücre ölüm sinyali, kaspaz-8 ve Bid (BH3-sadece Bcl-2 ailesinden bir molekül) tarafından indüklenen bir mitokondriyal süreç ile artırılabilir. Mitokondriden sitokrom-c açığa çıkar ve bu sitoplazmada apoptozu aktive edici faktör (APAF-1), TP ve prokaspaz-9 ile birlikte apoptozumu oluşturacak süreci başlatır. Bu kompleks, kaspaz-3 ve kaspaz-8 gibi bazı proteolitik enzimleri aktivasyonu sağlar [82, 83].

İntinsik yoldakından da anlaşılacağı üzere, hücre içinde başlatılır. Geri dönüşümü olmayan genetik hasar, hipoksi, aşırı yüksek sitozolik  $Ca^{2+}$  konsantrasyonları ve yüksek oksidatif stres gibi iç uyaranlar, mitokondriyal yolun başlatılmasına sebep olan bazı tetikleycileridir. İntinsik apoptoz yolağı, artmış mitokondriyal geçirgenliğin ve sitokrom-c gibi pro-apoptotik moleküllerin sitoplazmaya salınmasının bir sonucu olarak uyaranlardan bağımsız olarak başlar. İntinsik apoptoz yolubaşlıca Bcl-2 ailesine ait olan bir grup protein tarafından regüle edilir. Bcl-2 protein ailesi pro-apoptotik (Bax, Bak, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim ve Hrk) ve anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 ve Mcl-1) protein gruplarından oluşur ve apoptozun intrinsik yolağının regülasyonundan sorumludurlar. Anti-apoptotik proteinler, sitokrom-c'nin mitokondriden salınımını engelleyerek apoptozu düzenlerken, pro-apoptotik proteinler bu salınımı tetiklerler. Bcl-2 ailesinin üyeleri arasındaki dengenin bozulması, pro-apoptotik proteinlerin ifadesinde azalmaya ya da anti-apoptotik proteinlerin ifadesinde artmaya sebep olarak kaspaz-9 aktivasyonu engellenmektedir. Mitokondriyal intermembran boşluğundan sitoplazmaya başka faktörlerde salınır. Bu apoptotik faktörler arasında apoptoz indükleme faktörü (AIF), mitokondriden türetilmiş kaspaz aktivitesi (Smac), Düşük pI (DIABLO) ve Omi/yüksek sıcaklık gereksinimli protein ile doğrudan IAP bağlama proteini vardır. Sitokrom-c'nin

sitoplazmaya salınımı, sitokrom-c, Apaf-1 ve kaspaz-9'dan oluşan apoptozom olarak bilinen bir kompleksin oluşumunu sağlar. Apoptozom kaspaz-3'ün aktivasyonuna neden olur. Diğer taraftan Smac/DIABLO veya Omi/HtrA2 apoptoz proteinlerinin (IAP) inhibitörüne bağlanarak kaspazın aktivasyonunu tetikler ve IAP'lerin kaspaz-3 veya kaspaz-9 ile etkileşimlerinde bozulmaya neden olur [75, 84].

### 1.5.3 Apoptozun düzenlenmesi

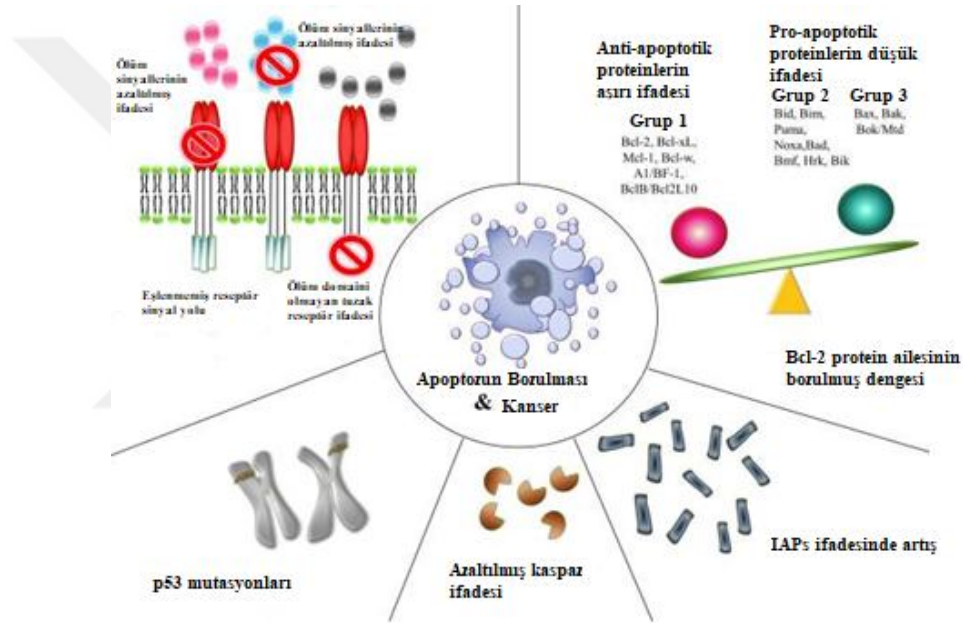
Apoptozun düzenlenmesi başlıca Bcl-2/Bax protein ailesi tarafından gerçekleştirilir. Bcl-2 protein ailesinin şimdiye kadar 20 üyesi tanımlanmıştır. Bu proteinlerden bazıları apoptoz inhibitörü olarak görev alırken (anti-apoptotik), bazıları da apoptozu tetikler ve pro-apoptotik proteinler olarak isimlendirilirler. Apoptotik ölüm sinyalinin alınmasından sonra Bax (pro-apoptotik) proteinleri, anti-apoptotik proteinler tarafından regülasyonu gerçekleştirilen mitokondri zarının stabilitesini bozarak iyon geçirgenliğini azaltırlar. Zardaki bu değişiklikler, sitokrom-c ve AIF (Apoptozis Inducing Factor) gibi mitokondri zariçinde yer alan faktörlerin sitoplazmaya geçmesine sebep olur. AIF doğrudan yoğunlaşan kromatine ve parçalanmış çekirdeğe yönelir. Sitoplazmadaki sitokrom-c bir sitoplazma proteini olan Apaf-1'e bağlanır. Bu komplekse ATP'nin de bağlanmasıyla 'apoptozom' olarak isimlendirilen protein kompleksi oluşur. Apoptozom prokaspaz-9'u aktive eder. Kaspaz-9 prokaspaz-3'ü keserek kaspaz-3'ü aktif duruma getirir ve bir seri kaspaz aktivasyonunu başlatır [82]. Şekil 1.10. de apoptozun regülasyonu gösterilmiştir.



Şekil 1.10. Apoptozun düzenlenmesini gösteren şema [85].

#### 1.5.4. Apoptoz ve karsinogenez

Bir hücreyi kanserleşmeye götüren süreç başlıca hücre çoğalmasının artması ve apoptozun azalmasına bağlı olarak gerçekleşir. Birçok kanser hücresi, anti-apoptotik proteinlerin ifadesini artırarak veya pro-apoptotik hücre ölüm bileşenlerinin aktivasyonunu gerçekleştirerek, hücrenin ölüm sürecinden kaçmak için farklı mekanizmalar oluşturmaktadır. Genel olarak, kanser hücrelerinin apoptoz sürecinden kaçış yolları şu şekillerde ifade edilebilir: 1. Bcl-2 proteinlerinin dengesinin bozulması, 2. p53 kusurları ve mutasyonları, 3. İnhibitör apoptoz protein ailesi (IAP) molekülleri ifadesinin artışı, 4. Kaspaz işlevinin azalması, 5. Reseptör sinyal yolağının bozulması (Şekil 1.11) [75].



Şekil 1.11. Apoptozdan kaçış yollarını gösteren şema [75].

##### 1.5.4.1. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin dengesinin bozulması

Apoptozda rol alan en önemli protein gruplarından bir tanesi Bcl-2 protein ailesidir. Bcl-2 protein ailesi pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerden oluşur. Bu proteinler apoptozun düzenlenmesinde özellikle mitokondriyal seviyede intrinsik yolda görev alırlar. Tüm Bcl-2 üyeleri dış mitokondriyal zarla lokalize olarak bulunurlar ve mitokondriyal zar geçirgenliğinden sorumlu olarak hücrelerin hayatta kalmasında önemli düzenleyicilerdir. Bcl-2 protein ailesi üyeleri görevlerine göre üç gruba ayrılır. Birinci

grup, dört Bcl-2 homologu (BH) domainine sahip, anti-apoptotik Bcl-2 proteinleridir ve hücreleri apoptotik uyarılardan korurlar. Bunların başlıcaları Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w'dur. İkinci grup Bcl-2 protein ailesi üyeleri pro-apoptotik aktivite göstererek apoptotik yolun tetiklenmesini sağlarlar. Bu protein grubu içerisinde Bid, Bim, Puma, Bad ve Bik gibi proteinler bulunur. Üçüncü grup Bcl-2 üyelerinin hepsi de dört BH domaini içerir ve pro-apoptotiktir. Bu sınıfa giren proteinler Bax, Bak ve Bok/Mtd'dir [86, 87].

#### **1.5.4.2. p53 mutasyonları**

p53 hücre yaşam döngüsünün en önemli proteini olarak görülür. Bunun nedeni p53 proteininin en iyi bilinen tümör baskılayıcı proteinlerden bir tanesi olmasıdır. 'Genom Muhafızı' olarak isimlendirilir. DNA yıkımını, kromozom anormalliklerini tespit etmek ve hücre döngüsünde tamiri başlatmak için döngüyü durdurmak p53 proteininin görevleri arasındadır. Keşfinden bu yana özellikle kanserdeki rolü ve etkisi oldukça çok araştırılmıştır. Bu protein sadece apoptozda değil hücre döngüsü, farklılaşma, DNA rekombinasyonu gibi birçok moleküler mekanizmalarda önemli rol oynamaktadır. Bugün bilinen insan kanser hastalıklarının yaklaşık yarısında p53 proteininin kusurlu olduğu rapor edilmiştir [88, 89].

p53, pro-apoptotik bir protein olan Bax'ın ifadesini artırarak sitokrom-c'nin mitokondriden salınmasını aktive eder ve sitokrom-c kaspaz kaskadını başlatarak hücre ölümünü tetikler. p53 proteini, genomumuzun bütünlük içinde kalması için hayati öneme sahiptir. Çoğu kanser türünde, p53 ve diğer bir önemli hücre döngü proteini olan retinoblastomalar ya kusurludur ya da ifadeleri susturulmuştur [90].

#### **1.5.4.3. Apoptoz inhibitör protein ailesi (IAPs'lar)**

Apoptoz inhibitörleri (IAP'ler), apoptotik yoldaki kanser hücrelerini apoptotik uyarıya duyarsızlaştıran bir grup anti-apoptotik faktördür. Başlıca kaspaz-3 ve kaspaz-7 olmak üzere, başlatıcı kaspazlara bağlanarak aktivitelerini inhibe eder ve hücre ölümünü engellerler. Şu anda memelilerde sekiz IAP tanımlanmıştır. Bunlar X-linked apoptoz inhibitörü (XIAP), hücrel IAP1 (cIAP1), cIAP2, Livin, IAP-like protein 2 (ILP2), nöral apoptoz inhibitör proteini (NAIP), Survivin ve BRUCE proteinleridir. IAP'ler, hücreleri apoptozdan korumak için bir proteinin inhibisyonuna yol açabilecek karmaşık etkileşimler

yoluyla birbirleriyle etkileşir. Kaspazların BIR domainine bağlanarak kaspazların substratlarıyla birleşmesini engellerler ve kaspazları inhibe ederler [91].

#### **1.5.4.4. Azaltılmış kaspaz aktivitesi**

Kaspazlar, hücre ölümünü düzenleyerek homeostaziyi korumak için önemli bir gen ailesidir. Kaspazlar, aktif bölgesindeki katalitik sistein kalıntılarına bağlı olan ve sadece substrattaki belirli aspartik asit kalıntılarından sonra ortaya çıkan bir reaksiyonda peptit bağlarını hidrolize eden endoproteazlardır. Kaspaz aracılı işlem substrat inaktivasyonuna yol açabilse de, aynı zamanda apoptoz ve enflamasyon gibi düzenli işlemlere katılan aktif sinyal molekülleri de üretebilir. Buna göre, kaspazlar genel olarak apoptozda (kaspaz-3, -6, -7, -8 ve -9, memelilerde) ve enfeksiyonda (kaspaz-1, -4, -5, -12) bilinen rolleri ile sınıflandırılmıştır. Apoptoza karışan kaspazlar etki mekanizmalarına göre başlatıcı kaspazlar (kaspaz-8 ve -9) ve uygulayıcı kaspazlar (kaspaz-3, -6 ve -7) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır [92].

Vücudumuz kendisini kanser gelişimine karşı korumak için çeşitli gelişmiş mekanizmalar kullanır. Bu mekanizmalar DNA mutasyonlarını tanır ve hatalı DNA'nın onarımını veya etkilenen hücrenin onkojenik hale gelmeden önce ölümünü indükler. Kaspazlar apoptoz için çok önemli olduğundan, bu enzimlerin ve bunların dahil oldukları yolların deregülasyonunun mutasyona uğramış hücrelerin kalıcılığına yardımcı olabilmesi ve tümör oluşumunu teşvik etmesi şaşırtıcı değildir [93].

#### **1.5.4.5. Bozulmuş ölüm reseptör sinyali**

Ölüm reseptörleri; tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör geni süper ailesinin üyeleridir, geniş bir aralıkta 20'den fazla protein içerirler. Hücrenin düzenlenmesi de dahil olmak üzere ölüm ve hayatta kalma, farklılaşma veya bağışıklık düzenlemesi gibi birçok biyolojik fonksiyonlarda görev alırlar [94]. TNF süper ailesinin ölüm reseptörleri yoluyla apoptotik yolaktaki sinyaller iyi aydınlatılmıştır ve ölüm reseptörleri artık kanserdeki en ilgi çekici terapötik hedeflerden birisi olmuşlardır. Ekstrinsik yoldan indüklenen hücre ölümü, TNF reseptör süper ailesinin çeşitli üyelerinin aracılık ettiği sinyalleri takiben kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. TNF süper ailesi, iki ila beş sistein açısından zengin hücre dışı tekrar dizisi ile karakterize edilir. TNF süper ailesine ait ölüm reseptörleri,

apoptotik sinyallerin iletimi için gerekli olan yaklaşık 80 amino asidin homolog, hücre içi ölüm alanını paylaşır. Fas veya Apo1 olarak adlandırılan CD95, TNF reseptörü süper ailesine ait en iyi bilinen ölüm reseptörüdür. Ölüm reseptörlerini hedeflemenin yararlı bir yaklaşım olduğu düşünülmektedir, çünkü ekstrinsik yol alternatif olarak veya tamamlayıcı olarak kanser hücrelerinde apoptozun yanı sıra kemoterapötiklerde ve ışınlamada intrinsik yol aracılı apoptozu indükler [95].

Ölüm sinyali yollarındaki bazı anormallikler hücrelerin eksintrik yol üzerinden apoptozdan kurtulmasına sebep olmaktadır. Bu tür anormallikler genellikle reseptörün aşağı sinyal yolağındaki düzenlemelerden meydana gelen bozulmalardan meydana gelmektedir [96, 97].

## 1.6. Kaspaz-3 Aktivasyonu

Kaspazlar, programlanmış hücre ölümünün (apoptoz) önemli araçlarıdır. Kaspazlar veya sisteine bağımlı aspartata özgü proteazlar, özellikle organ gelişimi sırasında önemli bir biyolojik olay olan bir hücre içinde apoptozu başlatmak ve uygulamak için çok önemli bir enzim ailesidir. Çevresel işaretler ve hücrel sinyaller, öncelikle kaspazların proteolitik aktivasyonu yoluyla programlanmış hücre ölüm kaskadının başlatılmasını tetikler. Spesifik bir efektör kaspaz, apoptozun başlaması üzerine kesilen ve böylece aktive edilen bir protein olan kaspaz-3'tür. Kesilmiş (Cleaved) kaspaz-3, poli ADP riboz polimeraz (PARP) ve diğer substratlar dahil olmak üzere, akış aşağı hedefler üzerindeki enzimatik aktivite yoluyla bir apoptotik sinyal yaymaktadır. Hücre biyolojisinde, enzimin hem parçalanmamış hem de parçalanmış versiyonlarını tespit eden kaspaz-3 antikoru, hücre ölümü indüksiyonunun güçlü göstergeleridir [98]. Ek olarak kaspaz-3, hem kaspaz-8 hem de kaspaz-9 başlatıcı kaspazlar tarafından kesilen ve aktive edilen büyük bir yürütücü kaspazdır [99]. Kaspaz-3 antikoru, potansiyel terapötik ajanların sitotoksik mukavemetini ve etkinliğini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu bulgularla birlikte, kaspaz-3 antikoru, apoptotik hücrelerin tanımlanmasında daha yaygın kullanımlarına ek olarak hastalık prognozu ve ilerlemesinin belirlenmesinde klinik bir rol oynayabileceğini göstermektedir [100].



## 1. KAYNAK ÖZETLERİ

Epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) fizyolojik işlevi, epitel doku gelişimi başta olmak üzere homeostazinin düzenlenmesinde önemli bir proteindir. Patolojik durumlarda, çoğunlukla akciğer ve meme kanserinde ve glioblastomda, EGFR tümör oluşumunun başlıca sebeplerinden birisidir. Benzimidazol türevi bileşiklerin bu protein kinaz üzerindeki etkinliği çeşitli çalışmalarla belirlenmeye çalışılmaktadır. Bu çalışmalardan bir tanesi M. J. Akhtar ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmadır. Bu çalışmada pirazol bağlı, bir dizi yeni benzimidazol türevi bileşikler sentezlenmiştir. Sentezlenen tüm bileşiklerin MCF-7, HaCaT, MDA-MB231, A549 ve HepG2 insan karsinoma hücre hatları üzerindeki sitotoksik aktivitelerini test ettikleri çalışmalarında bileşiklerin bu hücre hatları üzerinde EGFR reseptör inhibisyonu aktivesine sahip oldukları gözlemlenmiştir. Bileşiklerin çoğunun test edilen hücre hatları üzerine antiproliferatif etki gösterdiği rapor edilmiştir [101].

Fosfoinositol-3 kinaz (PI3K) inhibitörleri kanser tedavi çalışmalarında oldukça önemli bir yere sahiptir. Keza PI3K sinyal yolağının bozulması ve hücreye kontrolsüz besin girişi kanserin belirli özelliklerinden bir tanesidir. PI3K izoformları farklı şekillerde normal hücrenin kanser hücresine dönüşümü sürecini kontrol etmektedir ve PI3K beta, PTEN kusurlu tümörlerin tümörleşme sürecinde görev alan izoform olarak açığa çıkmıştır. Certal ve arkadaşları PI3K beta seçici inhibitörleri olarak görev yapan bir seri benzimidazol ve benzokiasol-pyrimidonların yeni bir serisini keşfettiler ve bunların optimizasyonunu gerçekleştirdiler. Bu bileşiklerden bazıları PTEN kusurlu insan tümör ksenografları ile implante edilmiş SCID farelere oral olarak tolera edilebilen dozlarda uygulandığında, bunların tümör büyümesini geciktirdiğini göstermişlerdir [102].

Chen ve arkadaşları benzimidazol akridin bileşiğinin *in vitro* şartlarda insan kolon kanser hücre hatlarına karşı antikanser etkisini hangi mekanizmaları nasıl etkileyerek gösterdiğini araştırdılar. Bu benzimidazol türevi bileşiği kolon kanser hücre hatları SW480 ve HCT116 ile inkübe ederek bu hücre hatlarında bileşiğin çoğalma ve apoptoz ile ROS üretimi üzerindeki etkilerini gözlemlədiler. Bu bileşiğin, bu hücre hatlarında çoğalmayı baskıladığı gösterilmiştir. MTT ölçümleri IC<sub>50</sub> değerlerinin SW480 ve HCT116 hücre hatları için sırasıyla 6.77 ve 3.33 µmol/L olduğu hesaplanmıştır. Ayrıca bu bileşiğin HCT116 hücre hattında başlıca Bcl-2'nin ifadesinde azalışı ve ölüm reseptörü-5'in (DR5) ifadesinin artışını ve kaspazların aktivasyonunu sağlayarak apoptozu tetiklediği

gözlemlenmiştir. Bunun yanında bu bileşiğin HCT116 hücre hattında ROS üretimini ve mitokondriyal membran depolarizasyonunu indükleyerek bu hücre hatları üzerinde sitotoksik etki gösterdikleri tespit edilmiştir [103].

Niklosamid, kolon, meme ve miyelom dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde Wnt/-katenin sinyal yolağının etkili bir inhibitörü olarak geliştirilmiştir. Wnt/-katenin sinyalizasyon yolu meme kanseri (TNBC) hücre hatlarında, diğer meme kanseri alt tipleri ve normal dokularla karşılaştırıldığında yukarı sinyal yolağında düzenlendiği birçok araştırma ile tespit edilmiştir. Niklosamid gibi şu an kullanılan WNT/-katenin inhibitörleri, bu sinyalizasyon yolunu spesifik olarak hedeflemez ve *in vivo* olarak zayıf farmakokinetik/farmakodinamik özellik gösterirler. Bu bilgilere dayanarak Gangrade ve arkadaşları sentezledikleri yeni benzimidazol bileşiklerinin bu sinyal yolağını spesifik olarak hedeflediklerini göstermişlerdir. Bu bileşiklerden bazılarının TNBC hücre hatları üzerinde normal hücrelerde olduğundan daha fazla sitotoksik aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Bunu da, kanser hücre hatlarında normal hücre hatlarında olduğundan daha fazla mTOR sinyalizasyonunu inhibe ederek gerçekleştirdikleri ortaya konulmuştur. Bu yeni bileşiklerden bazılarının, Wnt/-katenin sinyal yolağını inhibe etmelerinin yanı sıra mTOR, STAT3 ve Nrtch sinyalizasyonlarını da azalttıkları saptanmıştır [104].

Kolorektal kanser (CRC) Dünya çapında oldukça yaygın ve en sık görülen malignant tümörlerden biridir. Şu anki kullanılan terapiler bu tümör grubu üzerinde oldukça sınırlı tedavi olanağı sunmaktadır. L.J. He ve arkadaşlarının sentezledikleri bir dizi benzimidazol-isoquinolinon türevi bileşiğin özellikle kolorektal kanser hatları üzerinde etkili antikanser özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu bileşiklerin iki önemli hücre hattı olan SW480 ve HT29 hücre hatlarında hücre döngüsünün G(2)/M fazında döngüyü durdurarak, p21 ve p53 aktivitelerinde artışa yol açtığı gösterilmiştir. Bunun yanısıra, yine aynı çalışmada, CRC hücre hatlarında mitokondriyal aracılı apoptozun da tetiklendiği gözlenmiştir. İlginç bir şekilde AKT, mTOR ve 4E-BP1 seviyeleri azalırken, PTEN'nun hücre içindeki seviye ve stabilitesinde bir değişiklik gözlenmemiştir. PTEN'u PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının kontrolünü gerçekleştirdiği için antiproliferatif etkilerin PTEN-aracılı tümör baskılaması yoluyla meydana geldiği tespit edilmiştir [105].

Nayak ve arkadaşları sentezledikleri 2-aril benzimidazol bileşiğinin insan meme kanser hücre hattı MCF-7 üzerindeki sitotoksik etkisini inceledikleri araştırmalarında, bu bileşiğin hücreleri, hücre döngüsünün G(2)/M fazında durduğunu göstermişlerdir.

Topoizomeraz II inhibisyon ölçümü ve Western blot analizi bu bileşiğin etkili bir şekilde topoizomeraz II'yi inhibe ettiğini ve bunun da hücreyi apoptotik hücre ölümüne yönlendirdiğini göstermiştir. Çalışma bu bileşiğin, hücreleri kaspaz bağımlı olmayan bir yol üzerinde apoptotik yola götürdüklerini ortaya çıkarmıştır. Benzimidazol türevi bileşiğin tümör olmayan meme epitel hücreleri olan MCF-10 üzerinde çok az sitotoksik etkiye sahip olduğu da belirlenmiştir [106].

Zhao ve arkadaşları tarafından iki tane bakır içeren benzimidazol bileşiği sentez edilmiş ve bu bileşiklerin karakterizasyonu yapılmıştır. Bu bileşiklerin farklı kanser hücre hatları (SMMC7721, BGC823, HCT116 ve HT29) üzerindeki sitotoksik etkileri MTT analiz yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. Bu iki bileşiğin özellikle HCT116 hücre hattı üzerinde çoğalmayı inhibe etme özelliklerine sahip oldukları gösterilmiştir. Morfolojik değişiklikler ve flowsitometri analizi, bu benzimidazol bileşiklerinden bir tanesinin HCT116 hücrelerini apoptotik yola sürüklediğini ortaya koymuştur. Bu deneysel sonuçlar, benzimidazol-kinolinil bazlı bakır komplekslerinin potansiyel antineoplastik ajanlar olarak kullanılmak üzere geliştirilmesinde faydalı olabileceğini ve bileşiklerin *in vivo* etkilerinin farmakolojik mekanizmalarını araştırmak ve yeni endojen bakır bazlı antikanser ajanlarının geliştirilmesini kolaylaştırmak için çalışılmaya değer potansiyele sahip olduğunu göstermiştir [107].

Benzimidazol bileşiklerin hedefleri arasında bulunan apoptotik yolakla ilgili birçok çalışma literatüre girmiştir. Bu çalışmalardan bir tanesi Yurttaş ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmadır. Yurttaş ve arkadaşları, sentezledikleri benzimidazol türevlerinin A549 ve C6 rat glioma hücre hatlarındaki sitotoksik etkilerini; MTT, BrdU ve flowsitometri analizleri ile araştırdıkları çalışmalarında bu bileşiklerin bu hücre hatları üzerinde oldukça seçici özellik gösterdiklerini belirlemişlerdir. Bileşiklerden üç tanesinin C6 ve MCF-7 tümör hücrelerinde apoptotik yolu tetikleyerek hücreleri ölüme götürdüklerini tespit etmişlerdir. Bir diğer bileşiğin bu hücre hatlarında nekrotik ölüm yolğını kullanarak hücreleri ölüme götürdükleri belirlenmiştir [108].

Apoohan ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada kobalt ve çinko bağlı 14 benzimidazol bileşiğinin akciğer kanser hücre hattı (A549) ve sağlıklı akciğer epitel hücreleri (BEAS-2B) üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmış ve bu kanser hattı için mevcut kullanılan kemoterapotik ajan olan sisplatinin sitotoksik etkisi ile karşılaştırılmıştır. MTT analizi sonucu 14 bileşik içinde üç bileşiğin IC<sub>50</sub> değerleri A549 üzerinde sisplatin

kadar iyi iken bu üç bileşiğin sağlıklı hücre hattı BEAS-2B üzerindeki sitotoksik etkilerinin sisplatininden çok daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Çalışmalarda bu bileşiklerin antimikrobiyal aktiviteleri de ortaya konmuştur [109].

Asetohidrazin kökenli benzimidazol bileşiklerinin özellikle antimikrobiyal etkilerinin araştırıldığı çalışmalar içinde, Ansari ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada sentezledikleri asetohidrazin benzimidazol bileşiklerinin antibakteriyel ve antifungal aktivitelerini araştırmışlardır. Çalışmalarının sonunda sentezledikleri tüm benzimidazol türevi bileşiklerin özellikle gram-pozitif bakterilere karşı etkili antimikrobiyal özelliklere sahip olduğunu saptamışlardır. Özellikle geliştirdikleri bu benzimidazol bileşiklerdeki oksadiazol heterosiklik halkanın 2 pozisyonunda bulunan yan zincirdeki karbon atomu sayısı arttıkça, *S. aureus*, *B. subtilis* ve *C. albicans*'a karşı antimikrobiyal aktivitenin yoğunluğunda bir artışa sebep olduğu gözlemlenmiştir [110].

Farklı benzimidazol türevi bileşiklerin antikanser ve antimikrobiyal aktivitelerinin gösterildiği şimdiye kadar yapılan çalışmalar içinde bir diğer çok çalışılan benzimidazol türevi bileşikler indol bazlı benzimidazollerdir. Ashok ve arkadaşları, indol bazlı triheterosiklik halka içeren bazı benzimidazol türevi bileşiklerin antimikrobiyal ve antioksidan etkilerine bakmışlardır. Bu bileşiklerden bazılarının *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv suşuna karşı oldukça etkili olduğu MİK yöntemiyle belirlenmiştir. Yine, bazı bileşiklerin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> giderme aktivitesine sahip olduğu ve bazı bileşiklerin de bakteriyel ve fungal suşlara karşı etkili antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir [111].

Benzimidazol bileşiklerin antimikrobiyal etkilerinin gösterildiği bir çalışmada Kılıçgil ve arkadaşları karboksilat ve karboksiamid içeren benzimidazol bileşiklerinin bazılarının özellikle *C. albicans* üzerine etkili antifungal etkiye sahip olduğunu rapor etmişlerdir [112].

Daha etkili benzimidazol bileşiklerin geliştirilmesi için sentezlenen bir başka tür benzimidazol türevide pyridin ve piperidin halka sistemlerine sahip benzimidazol türevi bileşikleridir. Bu kombinasyonun çeşitli biyolojik aktivitelerdeki hedef moleküllere bağlanma ve hibridizasyonu bakımından avantaj sağladığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Bu çalışmalardan bir tanesi de Beulah ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmadır. Beulah ve arkadaşları spektral ve elemental analiz yöntemleri kullanarak bazı benzimidazol-pyridin-piperidin bileşiklerini sentezlemişlerdir. Çalışmada bu bileşiklerin

çeşitli bakteri, küf ve mayalar (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*) üzerine antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Bu bileşiklerden bir tanesinin *Bacillus subtilis* hariç kullanılan diğer türler üzerine mevcut kullanılan antimikrobiyal ilaçlara göre daha etkili olduğu rapor edilmiştir [113].

Benzimidazol bileşiklerin kanser hücrelerine karşı apoptotik yolu tetikleyerek tümör hücrelerinin elimine edilmesini sağlamak amacıyla geliştirilmesine bir örnek Blaszcak ve arkadaşları tarafından ortaya konmuştur. Sentezledikleri bazı yeni benzimidazol türevi bileşikler geliştirilmiş ve akciğer kanser hücre hattı (A549) üzerine sitotoksik etkileri incelenmiştir. Çalışmada WST-1, apoptoz testi (kaspaz-3/7 ölçümü) ve *in situ* DNA yıkım ölçüm kiti kullanılmıştır. Test edilen bileşiklerden dört tanesinin çok iyi antiproliferatif özellik gösterdiği, üç tanesinin de hipoksiye seçici sitotoksik özellik gösterdiği tespit edilmiştir [114].

Benzimidazol türevi bileşiklerin antimikrobiyal aktivite etkinliklerinin çalışıldığı bir diğer çalışmada Çetinkaya ve arkadaşları tarafından benzimidazol, benzotiazol ve benzoksizolium bileşiklerinin azolyum tuzları ve nötral 2-aril türevleri geliştirilmiştir. Bu bileşikler H-1, C-13 NMR spektroskopisi ve mikro analitik metotlarla karakterize edilmiştir. Geliştirilen bu bileşiklerin *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) bakteri ve *Candida albicans* ve *Candida tropicalis* maya suşları üzerindeki antimikrobiyal etkileri gözlemlenmiştir. MİK analizi sonucunda özellikle benzotiazolium ve benzoksizolium tuzlarından oluşan benzimidazol bileşiklerinin antimikrobiyal aktivitelerinin daha etkili oldukları tespit edilmiştir [115].

Bazı bis-benzimidazol türevlerinin sentezlendiği ve antimikrobiyal etkinliğinin tespit edildiği çalışma Küçükbay ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Sentezledikleri bileşiklerin yapıları H-1-NMR, C-13-NMR ve FT-IR spektroskopik yöntemlerle belirlenmiştir. Sentezlenen bu bileşiklerin bazılarının disk difüzyon metodu ile antimikrobiyal etkilerine bakıldığında 8 ile 28 mm aralığında etkili oldukları gözlemlenmiştir. Özellikle referans bileşikler olarak kullanılan cefozine ve venistatin ile karşılaştırıldıklarında bileşiklerin çoğu incelenen suşlara karşı yüksek antibakteriyel ve antifungal aktiviteler göstermiştir [116].

Yurttaş ve arkadaşları sentezledikleri hidrazon parçacıklı benzimidazol türevi bileşiklerin antimikrobiyal etkilerini inceledikleri çalışmalarında, bazı benzimidazol bileşiklerinin *Pseudomonas aeruginosa* ile *Candida albicans* ve *Candida glabrata* üzerine etkili antimikrobiyal aktivite gösterdiklerini rapor etmişlerdir [117].

Kobalt ve bakır içerikli benzimidazol türevi bileşiklerin çalışıldığı bir çalışmada Praven ve arkadaşları benzimidazol temelli metal organik-kompleks bileşikler sentezlemiş ve insan akciğer kanser hücre hattı (A549) ve normal fare embriyonik fibroblast hücre hattı (NIH-3T3) üzerine sitotoksik etkilerine bakmışlardır. 650 nm lazer destekli yaptıkları çalışmada her iki hücre hattı da lazer uygulanmasından etkilenmesine rağmen A549 hücre hattında normal hücrelere kıyasla büyük oranda hücre yıkımı olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışma fototermal etkiyle kansere karşı etkili sonuçlar alınabileceğini de gösteren bir çalışmadır [118].

Mitokondri üzerinden (intrinsik apoptoz yolağı) kanser hücrelerinin apoptotik yola sokulması benzimidazol temelli çalışmalarda denenen yollardan biridir. Bu hedefe yönelik Qi ve arkadaşları benzimidazol bileşiklerinin antimikrobiyal ve antikanser etkilerinin araştırıldığı çalışmalarında, geliştirdikleri bakır (II) dipeptid temelli benzimidazol bileşiklerinin etkili sonuçlar ortaya koyduklarını vurgulamışlardır. Sentezledikleri bütün bileşiklerin test edilen organizmalarda (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*) ve kanser hücre hatlarında (A549, HeLa and PC-3) kayda değer antimikrobiyal ve antikanser etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar, bileşiklerin özellikle HeLa hücre hattını ROT aracılı mitokondriyal yolu fonksiyon dışı bırakarak apoptotik sürece yönlendirdiğini göstermiştir [119].

Servikal karsinoma Dünya çapında özellikle kadınlarda en sık görülen üçüncü kanser tipidir. Sisplatin gibi mevcut klinik tedavilerde kullanılan ilaçlar bu kanser türü için sınırlı bir tedavi sunmaktadır. Bu kanser türüne karşı daha etkili ilaç alternatifleri geliştirmek için benzimidazol türevi bileşikler oldukça iyi alternatifler olarak görülmektedir. Bu amaçla Qiao ve arkadaşları geliştirdikleri bakır bağlı benzimidazol türevi bileşiklerin DNA yıkımı, antiproliferatif ve apoptotik etkilerini araştırdıkları çalışmalarında bu bileşiklerin bir oksidatif yol boyunca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında pUC19 plazmid DNA'sında tek zincir kırıkları oluşturduklarını göstermişlerdir. Sitotoksik çalışmalar, bu benzimidazol komplekslerinin servikal karsinoma kanser hücre hattı HeLa hücrelerinde

çoğalmayı inhibe ettiklerini ve bunu da HeLa hücrelerinde DNA yıkımına yol açarak gerçekleştirdiklerini ortaya koymuştur. Uygulanan bu benzimidazol kompleks bileşiklerin, bu hücre hatlarında hücre döngüsünü S fazında tutarak kaspaz-3 ve kaspaz-9'un yukarı sinyal yolağının düzenlemesini sağladığını ve mitokondriyal potansiyeli bozarak apoptozu tetiklediklerini göstermiştir [120].

Karbon monoksit (CO) kanser patogenetiğinde rol oynayan önemli bir sinyal molekülüdür. Memelilerde Hem'in enzimatik yıkımı CO üretilmesine sebep olur. Hem oksijenaz 1 (HO-1) Hem'in CO, ferrus demiri ve biliverdine yıkımını katalizler. CO HO-1'i indükler ve hücre çoğalması durur. Kanser hücreleri bazı stres faktörlerine maruz kalır (hipoksia, ROT, cis-platin ve oksidatif stres) ve HO-1 oksidatif strese karşı hücreyi koruyucu rol üstlenir ve apoptoz, metastaz, anjiyogenez ve hücre çoğalması süreçlerini durdurur. Üstün ve arkadaşları tarafından hücrelerdeki bu mekanizmaya dayanarak CO-serbest bırakan molekül (CORM) içeren manganez bağlı benzimidazol türevi bileşikler sentezlenmiştir. Bu benzimidazol türevleri ile insan meme kanser hücre hattı (MCF-7) üzerinde yaptıkları sitotoksik çalışma, bu bileşiklerin hücre hattında CO'in serbest bırakılması yoluyla hücre çoğalmasını durdurduğunu ve sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymuştur [121].

Meme ve servikal kanser türlerinin tedavisi için benzimidazol türevi bileşikler iyi birer potansiyel bileşikler olarak görülmektedir. Reddy ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışma bu bilgiyi destekler niteliktedir. Reddy ve arkadaşlarının geliştirdikleri kırk farklı pirazol içeren benzimidazol hibrit bileşikleri üç insan tümör hücre hattına (A549, MCF-7 ve HeLa) uygulanarak bu hücrelere karşı potansiyel antiproliferatif aktiviteleri ortaya konmuştur. Bu bileşiklerden bazıları tüm kanser hücrelerine karşı potansiyel büyüme inhibisyonu özelliği göstermiştir. Daha detaylı çalışmalar için kullanılan MCF-7 hücre hattında yapılan çalışmalarda, uygulanan bileşiklerin bu hücre hattında morfoloji, migrasyon ve uzun dönem kolonogenik yaşamı oldukça etkiledikleri gözlemlenmiştir. Flow sitometri çalışması bu bileşiklerin MCF-7 hücrelerini, siklin D2 ve CDK2 üzerinden G1 fazında durdurduklarını ortaya çıkarmıştır. Floresan boyama ve DNA fragmentasyon analizleri hücre çoğalmasının apoptozun tetiklenmesi yoluyla durdurulduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, bileşiklerin mitokondriyal membran potansiyelini bozduğu ve reaktif oksijen türlerinde artışa sebep olduğu tespit edilmiştir [122].

Tirozin kinazlar protein kinaz ailesinin önemli üyelerindedir. Bu tirozin kinazlar içinde özellikle reseptör kinaz EGFR birçok kanser çalışmasında ilgi odağı olmuştur. Bu nedenle birçok kanser türü tedavisi için hedef proteinler arasında başta gelir. Bu amaçla Chhajed ve arkadaşları tarafından geliştirilen bazı EGFR antagonisti olan benzimidazol türevi bileşiklerin, kolorektal kanser hücre hattı (HCT116) ve küçük hücre dışı akciğer kanser hücre hattı (H460) üzerindeki sitotoksik aktiviteleri propidiyum iyodin floresan ölçümü ve tripan mavisi canlılık ölçümü yöntemleriyle araştırılmıştır. Bileşiklerin sağlıklı hücre hatları ve kanser hücre hatları üzerindeki etkilerini karşılaştırmalı olarak inceleyebilmek için insan epitel böbrek hücre hattı da sağlıklı hücre hattı olarak kullanılmıştır. Çalışmaları sonucunda sentezledikleri bu bileşiklerin bazılarının, sağlıklı hücre hattına kıyasla kanser hücre hatları üzerinde daha etkili sitotoksik etki gösterdikleri tespit edilmiştir [123].

Benzimidazol bileşiklerinin kanser çalışmalarında yoğunlukla kullanılmasının en önemli nedenlerinden biri sahip olduğu halka sisteminden dolayı DNA bağlanma afinitelerinin yüksek olmasıdır. Bu hedefe yönelik birçok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmalardan bir tanesi de Farmanzadeh ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmadır. Farmanzadeh ve arkadaşları geliştirdikleri bazı sitotoksik özelliklere sahip benzimidazol türevi bileşiklerin DNA baz çiftleri ile olan etkileşimlerine bakılmıştır. Geliştirilen bu benzimidazol bileşiklerden bazılarının DNA baz çiftlerine yüksek bağlanma kapasitelerine sahip oldukları ve bunun sonucu olarak da etkili sitotoksik aktivite gösterdikleri saptanmıştır [124].

Hepatosellüler karsinoma (HCC) Dünya'daki en yaygın ve ölümcül kanser türlerinden biridir. Bu kanser türünün tedavisi için kullanılan ilaçların sınırlı bir tedavi göstermesi farklı bileşiklerin geliştirilmesi ihtiyacını doğurmuştur. Sadece yeni bileşiklerin değil bu bileşiklerin birbirleriyle kombine edilerek kanser hücrelerine uygulanması tedavi yöntemlerinden biridir. Bu çok hedefli tedavi için yapılan çalışmalardan bir tanesi de Hsu ve arkadaşlarının pirolodin yan zincirine sahip bazı benzimidazol türevlerini geliştirdikleri bir çalışmadır. Bu çalışmada bileşiklerin hem tek başlarına hem de mevcut kullanılan ilaç olan sorafenib ile kombine ederek karaciğer kanser hücre hatları üzerine uygulamışlardır. Alamar mavisi ve tripan mavisi yöntemlerini kullanarak bu bileşiklerin sitotoksik etkisi araştırılmış ve hücre içi sinyalizasyon yolağını nasıl etkiledikleri de western blotlama, Q-PCR ve IHC boyama yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. *In vivo* sitotoksik aktivitelerini belirlemek için de HuH7 ksenograf modeli kullanılmıştır. Yapılan bu çalışmada



benzimidazol türevlerinin bazılarının hem tek başlarına hem de sorafenib ile birlikte HCC hücre hatlarında çoğalmayı baskıladıkları gösterilmiştir. Bu bileşiklerden bazılarının Akt sinyalizasyonunu ve bu sinyalizasyon yolağının aşağı akış yolundaki p70S6K fosforilasyonunu inhibe ettikleri görülmüştür. Bazılarının da sorafenib ile birlikte JNK fosforilasyonunu inhibe ettikleri tespit edilmiştir. HuH7 ksenografları model fareler üzerindeki çalışmalar bu benzimidazol bileşiklerinin bazılarının, düşük doz sorafenib ile kombine edilmiş türevlerinin tümör gelişimini yan etki göstermeden oldukça iyi bir şekilde önledikleri de ortaya çıkarılmıştır [125].

Mikrotübüller antikanser için önemli hücresel hedeflerdir ve mikrotübül mekanizmasının bastırılması hücreyi etkin bir şekilde bloke eder. Bu bloke hücreyi sonunda apoptotik yola sürükler. Bu nedenle mikrotübül oluşumunun inhibe edilmesi kanser çalışmalarında potansiyel hedeflerdir. Bu amaçla Kamal ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada bir seri imidazopiyridin/imidazopiyrimidin-benzimidazol türevi bileşik sentezlenmiştir. Bu bileşiklerin antikanser özellikleri araştırılmıştır. Bu bileşiklerin akciğer kanser hücre hattı (A549), prostat kanser hücre hattı (DU-145), insan servikal kanser hücre hattı (HeLa) ve melanoma kanser hücre hattı (B-16) üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiştir. Bu bileşikler içerisinde özellikle iki tanesinin A549 üzerine etkili sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Flowsitometrik analizler bu bileşiklerin kanserli hücreleri hücre döngüsünün G2/M fazında tuttuklarını ve kaspaz-3 aktivitesi yoluyla apoptozun tetiklendiğini göstermiştir. Bu bileşiklerin A549 hücre hattında hem moleküler düzeyde hem de hücresel düzeyde mikrotübül kurulumunu inhibe ettikleri, tübülün polimerizasyon yöntemi ile tespit edilmiştir [126].

Badawey ve Kappe yaptıkları çalışmada bir seri prido-benzimidazol türevi bileşikler sentezlenmiştir. Bubleşiklerin antineoplastik etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, bileşiklerden bazılarının lösemi kanser hücre hatları üzerine oldukça kuvvetli sitotoksik etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada bu bileşiklerin antifungal etkilerinde bakılmıştır. Ancak bileşiklerin lösemi kanser hücre hattına karşı gösterdikleri yüksek sitotoksik etkiye rağmen anti-fungal etkilerinin kısıtlı olduğu tespit edilmiştir [127].

Apoptotik yolağın tetiklenmesinin kanser tedavi çalışmalarında önemli hedefler olduğu bilinmektedir. Bu amaç için benzimidazol bileşikler etkili potansiyele sahiptirler. Bu amaçla yapılan çalışmalardan bir tanesinde Bistrovic ve arkadaşlarının geliştirdikleri

bir seri amidin benzimidazol türevi bileşiğın A549 üzerine sitotoksik etkileri incelenmiş ve bazı bileşiklerin bu kanser hücre hattı üzerinde düşük dozlarda seçici ve sitotoksik aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu sitotoksik aktiviteyi apoptotik yolu ve nekrozu tetikleyerek gerçekleştirdikleri belirlenmiştir. Özellikle bir maddenin TGM2, CDK9, SK1 ve p38 MAPK gibi protein kinazların inhibisyonunu gerçekleştirdiği tespit edilmiştir [128].

Karışık ligandlı dört yeni koordinasyon bileşiğının sentezini gerçekleştiren Vlaicu ve arkadaşları bu bileşiklerin fiziko-kimyasal ve biyolojik özelliklerini sundukları çalışmalarında özellikle kobalt bazlı benzimidazol bileşiklerin antimikrobiyal ve sitotoksik etkilerini incelemişlerdir. Kimyasal formülleri, kimyasal analizi kütle spektrometresi verileri ile ilişkilendirerek elde edilmiş, ligand koordinasyon modları Fourier dönüşümü-kızılötesi ölçümleri ile manyetik moment ölçümleri komplekslerdeki kobalt iyonunun trigonal bipiramidal geometrisi UV-Vis-NIR spektrumlarının veri korelasyonu ile belirlemiştir. Biyolojik testler, çeşitli mikrobiyal suşlara karşı gerçekleştirilmiş, sitotoksikite, HCT8 hücresel hatları üzerinde değerlendirilmiş ve hücre döngüsü analizi, HT29 hücresel hatları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmadaki mikrobiyolojik analizler, Co (II) komplekslerinin *Candida albicans* 1760, *Enterococcus faecium* E5, *Bacillus subtilis* ATCC 6683 ve *Escherichia coli* ATCC 25922'ye karşı çok iyi bir aktivite gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Bu çalışmanın sonuçları Co (II) komplekslerinin etkili farmakolojik ajanlar olarak kullanılmaya uygun olduğunu göstermiştir [129].

Benzimidazol türevi bileşikleri aynı zamanda çok hedefli (multitarget) ilaçlar geliştirmek için de uygun adaylar olduklarını gösteren bir çalışmada Han ve arkadaşları sentezledikleri yeni bir karışık çinko bazlı ligand koordinasyonlu benzimidazol polimeri kanserli lenfoma hücrelerine uygulanarak bu bileşiğın apoptotik sinyal yolağındaki etkisi incelenmiştir. İlk olarak, hücre apoptoz saptama kiti, bileşik tedavisinden sonra apoptotik lenfoma hücrelerinin yüzdelerini saptamak için kullanılmıştır. Daha sonra, lenfoma hücrelerinde p53 ve bcl-2 genlerinin göreceli ekspresyonunun değerlendirilmesi için gerçek zamanlı RT-PCR gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar çinko bazlı benzimidazol bileşik ve doksorubisin karışımının, kanserli lenfoma hücrelerinde p53 ifadesini yaklaşık 4-5 kat arttırırken, bu bileşik-doksorubisin karışımı bu hücrelerdeki Bcl-2 protein ifadesini yaklaşık 4-5 kat azaltmıştır. Bu sonuç çinko bazlı benzimidazol bileşik ve doksorubisinin çok hedefli (multitarget) kombine bir bileşik etkiye sahip olduğunu göstermiştir [130].

Bakteriler, bugün klinik uygulamalarda kullanılan mevcut ilaçlara karşı büyük direnç göstermektedir ve dünya çapında önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle, yeni antibakteriyel ajanların geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Dokla ve arkadaşları tarafından fenotipik tarama kullanılarak otuz bir benzimidazol türevini *E. coli* JW55031'e (TolC mutant suşu) karşı sentez ve test edilmiştir. Bu bileşiklerden bir tanesi, 2 µg/mL'lik MİK değeri ile güçlü aktivite göstermiş, ancak *E. coli* BW25113 (vahşi tip suş) dahil olmak birkaç gram-negatif bakterilere karşı aktivite göstermemiştir. Bileşiğin kolistin ile kombinasyonu, yabani suşlara karşı antibakteriyel aktivitesini kısmen eski haline getirmiştir (MİK aralığı, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* ve *P. aeruginosa*'ya karşı 8-16 µg/mL doz aralığında) [131].

Bir dizi kobalt (II) ve çinko (II) koordinasyonlu benzimidazol bileşiğinin sentezinin ve yapısal/spektroskopik karakterizasyonunun yapıldığı bir çalışmada Sandoval ve arkadaşları bu bileşiklerin *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *Proteus vulgaris*'e karşı *in vitro* antimikrobiyal aktiviteleri açısından değerlendirmişlerdir. Ayrıca bileşiklerin sitotoksik aktiviteleri de insan kanser hücre hatları, HeLa, HCT-15 ve SKLU-1 kullanılarak değerlendirilmiştir. Kobalt bağlı iki bileşiğin Gram (+) ve Gram (-) mikroorganizmalara karşı geniş bir aktivite yelpazesi gösterdiği, HeLa ve HCT-15 hücre hatlarını üzerinde de yüksek sitotoksik aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir. Bu bileşiklerden bir tanesinin insan kanser hücreleri üzerindeki gösterdiği sitotoksik etkinin sisplatinden daha iyi olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu bileşiklerin hücre hatlarına yönelik seçicilikleri onları antikanser aktiviteleri açısından çalışmaya değer adaylar yapmaktadır[132].

Noha ve arkadaşları tarafından aril gruplarına sahip yeni bir benzimidazol türevi bileşik serisi tasarlanmış ve potansiyel sitotoksik aktiviteye sahip moleküller olarak sentezlenmiştir. HCT-116 hücreleri üzerindeki *in vitro* sitotoksik aktivite tayinleri, N-(benzimidazotiyazolone) asetamidler içeren bu bileşiklerden bazılarının, kamptotesin (CPT) ile karşılaştırıldığında yüksek sitotoksik bileşikler olduğu tespit edilmiştir. Test edilen bileşikler, CPT ve Podofillotoksin (Podo) ile karşılaştırıldığında ikili bir topoizomeras I-β (Topo I-β) ve tübülün inhibe edici aktivitelere sahip oldukları gösterilmiştir. Bu bileşiklerin nano-molar konsantrasyonda en iyi inhibe edici aktiviteyi p-tübülün polimerizasyonunu inhibe ederek gerçekleştirdikleri tespit edilmiştir. Hücre döngüsü analizinin sonuçları ve ayrıca HCT-116 hücreleri üzerindeki anneksin-V sonuçları bu bileşiklerden bazılarının sırasıyla 1.33 ve 1.30 kat CPT'den daha yüksek bir pro-apoptotik aktiviteye sahip olduğunu

göstermiştir. Ayrıca, bileşiklerin p53, Bax / Bcl-2 oranı ve kaspaz 3/7 konsantrasyonu, CPT'ye göre daha yüksek bir seviyeye çıkardıkları ve kromozomal kararsızlığı modüle ederek HCT-116 hücrelerinin radyosensitize etme aktivitesini düzenledikleri tespit edilmiştir [133].



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Tezde Kullanılan Benzimidazol Bileşikleri

Bu çalışmada kullanılan benzimidazol bileşikleri, çinko ve kobalt bağlı dokuz farklı benzimidazol türevi bileşiklerdir (Şekil 3.1). Bu bileşikler İnönü Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Hasan Küçükbay ve arkadaşları tarafından sentezlenmiştir. Bileşikler bu çalışmada numaralar verilerek ifade edilmiştir. Bu bileşiklerin açık adları ve bu çalışmada ifade edilen numaraları şöyledir;

Bileşik 1:1-(4-Metilbenzil)-5(6)-nitrobenzimidazol

Bileşik 2: Diklorobis[1-(4-klorobenzil)-1H-benzimidazol-κN<sup>3</sup>]çinko(II)

Bileşik 3:Diklorobis[1-(4-tolilbenzil)-1H-benzimidazol-κN<sup>3</sup>]çinko(II)

Bileşik 4:Diklorobis(1-(4-klorobenzil)-5(6)-metil-1H-benzimidazol-κN<sup>3</sup>)çinko(II)

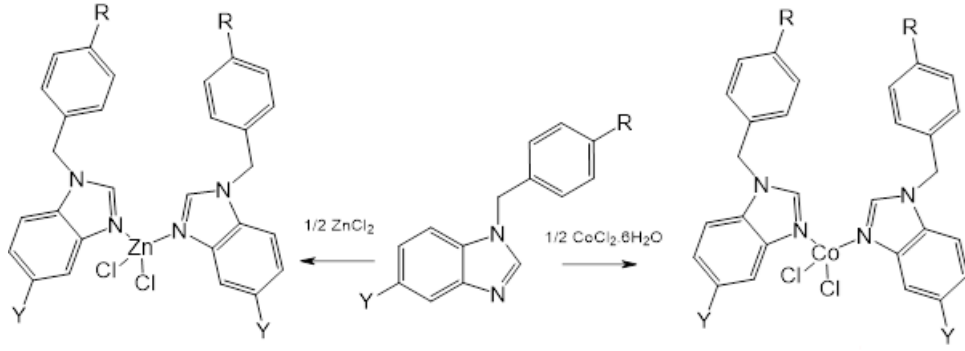
Bileşik 5: Diklorobis(1-(4-metilbenzil)-5(6)-nitro-1H-benzimidazol-κN<sup>3</sup>)çinko(II)

Bileşik 6: Diklorobis(1-(4-metilbenzil)-5(6)-metil-1H-benzimidazol κN<sup>3</sup>)çinko(II)

Bileşik 7:Diklorobis[1-(4-bromobenzil)-1H-benzimidazol-κN<sup>3</sup>]kobalt(II)

Bileşik 8: Diklorobis(1-(4-metilbenzil)-5(6)-nitro-1H-benzimidazole κN<sup>3</sup>)kobalt(II)

Bileşik 9: Diklorobis(1-(4-metilbenzil)-5(6)-metil-1H-benzimidazol-κN<sup>3</sup>)kobalt(II)



**Bileşik 2.** R: Cl, Y:H

**Bileşik 3.** R: CH<sub>3</sub>, Y:H

**Bileşik 4.** R: Cl, Y:CH<sub>3</sub>

**Bileşik 5.** R: CH<sub>3</sub>, Y:NO<sub>2</sub>

**Bileşik 6.** R: CH<sub>3</sub>, Y:CH<sub>3</sub>

**Bileşik 1.** R: CH<sub>3</sub>, Y:NO<sub>2</sub>

**Bileşik 7.** R: BR, Y:H

**Bileşik 8.** R: CH<sub>3</sub>, Y:NO<sub>2</sub>

**Bileşik 9.** R: CH<sub>3</sub>, Y:CH<sub>3</sub>

### Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan çinko ve kobalt bağlı benzimidazol bileşikleri.

Bileşikler 5000 µg/100 µL konsantrasyonda olacak şekilde DMSO'da çözdürülerek stok çözelti hazırlanmıştır. Bileşiklerin konsantrasyon optimizasyonu farklı konsantrasyonlarda olacak şekilde hesaplanmış ve stok çözeltilerden besiyeri ile sulandırılarak kullanılmıştır.

### 3.2. Hücre Hatları ve Kültür Koşulları

Bu çalışmada insan küçük hücre dışı akciğer karsinomu hücre hattı (A549), sağlıklı insan bronşiyal epitel hücre hattı (BEAS-2B), karaciğer kanser hücre hattı (Hep3B) ve insan kolorektal kanser hücre hattı (HCT116) hücre hatları kullanılmıştır. Çalışmamız boyunca; hücreler %10 FBS (fetal bovin serum) ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) besiyerinde, 75 cm<sup>2</sup>'lik kültür flasksı içerisinde 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub> etüv koşullarında inkübe edilerek canlılıkları sürdürülmüştür.

### 3.3. Tripın Mavisi Yöntemiyle Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

Uygulanan bileşiklerin hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin mikroskop altında göz ile doğrudan, canlı ve ölü hücrelerin sayımı yoluyla tespit edildiği bir ölçüm yöntemidir. Bu yöntem temel olarak canlı hücrelerin hücre zarlarının tripan mavisi, eozin veya propidium gibi bazı boya ları geçirmemesi prensibine dayanır. Ölü hücrelerde ise membran zarında bozulmalar olduğundan dolayı seçici geçirgen özelliğini kaybetmiştir ve

bu boyalara karşı geçirendirler. Bu özelliğe dayanarak tripan mavisi uygulanan hücre süspansiyonlarında canlı ve ölü hücreler tespit edilir[134].

Flasklarda konfluent olan hücreler tripsin-EDTA uygulanarak süspansiyon haline getirildikten sonra 15 mL'lik falkonlara toplanmış ve toplanan hücreler 5 dk. 1000 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Santrifüj sonrası hücreler 10 mL DMEM besiyeri içinde homojen bir şekilde süspansiyon edilmiştir. Bu süspansiyon içinden 50 µl hücre alınarak yine 50 µl % 0,4'lük tripan mavisi ile hafifçe pipetaj yapılarak muamele edildikten sonra oda sıcaklığında 3-5 dakika beklenmiştir. Bu karışımdan 10 µl alınarak hemositometrenin bölmelerine aktarılmış ve ışık mikroskobu altında hücre sayımı yapılarak başta hazırlanan 10 mL'lik süspansiyon içindeki hücre sayısı hesaplanmıştır. 6 kuyucuklu plaklara her bir kuyucuk içinde  $10^5$  sayıda hücre olacak şekilde 10 mL'lik süspansiyondan hücre eklenmiş ve DMEM besiyeri ile 2500 µl'ye tamamlanmıştır. Bileşikler beş doz aralığında 20, 30, 40, 50 ve 100 µg/mL olarak uygulanmıştır. Etüvde inkübe edilen plaklardaki hücreler 24 saat sonunda Tripsin-EDTA kullanılarak kuyucuklardan toplanıp, 15 mL'lik falkonlara alınmıştır. Falkonlara alınan hücreler 5 dk. 1000 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatant atılmış ve falkonlarda kalan hücrelere 100 µL DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) eklenerek pipetaj ile süspansiyon haline getirilmiştir. Bu süspansiyonların her birine 5 µl % 0,4'lük tripan mavisi eklenip, 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Tripan mavisi eklenmiş bu süspansiyonlardan 10 µl alınarak hemositometrenin bölmelerine eklenmiştir. Işık mikroskobu altında canlı ve ölü hücrelerin sayımı yapılmıştır.

### **3.4. MTT Yöntemiyle Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi**

MTT analizi ile hücre metabolik aktivite ölçülmektedir ve buna bağlı olarak hücre canlılığı, çoğalması ve sitotoksikite ortaya konulmaktadır. MTT azalmasına bağlı olarak enzimatik aktivitenin kolorimetrik ölçümüne dayanan hücre çoğalma miktarının tespit edildiği bir yöntemdir. Canlı olan yani metabolik olarak aktif hücreler mitokondride gerçekleşen metabolik aktivite sonucunda, NADPH bağımlı dehidrogenazları aracılığıyla renkli tetrazolyum tuzlarını (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) mor renkli formazon kristallerine indirgerler (Şekil3.2). Böylece, oluşan renk değişimi kolorimetrik olarak saptanarak canlı hücre yoğunluğu belirlenir [135].



**Şekil 3.2.** Tetrazolyum tuzunun formazona dönüşümü.

Çalışmamızda MTT analizi için beş farklı doz belirlenmiştir. Bileşikler 5, 10, 30, 50 ve 100  $\mu\text{g/mL}$  olarak uygulanmıştır. Sisplatin 3, 5, 10, 30 ve 50  $\mu\text{g/mL}$  olarak uygulanmıştır. Bu doz aralıklarında uygulanan bileşiklerin ve sisplatinin hücreler üzerindeki %50 baskılayıcı değeri logaritmik eğim grafiği ile  $\text{IC}_{50}$  değerleri hesaplanmıştır [109].

Bir gün öncesinden 96 kuyucuklu plaklara, her bir kuyucukta  $5 \times 10^3$  sayıda hücre olacak şekilde 100  $\mu\text{L}$  besiyeri içinde hücre ekimi yapılmış ve 24 saat sonunda etüvde inkübe edilen plaktaki hücrelere, 5 farklı dozda olacak şekilde bileşikler uygulanıp etüvde inkübasyona bırakılmıştır. 24., 48. ve 72. saatlerde MTT uygulaması yapılmıştır. DPBS içinde hazırlanan thiazole, her kuyucuğa 20  $\mu\text{L}$  olarak eklenmiş ve MTT eklenmiş plaklar 2 saat ışık almayacak şekilde etüvde inkübe edilmiştir. Etüvden alınan plaklarda thiazol uzaklaştırıldıktan sonra her kuyucuğa 100 $\mu\text{L}$  DMSO eklenerek 5 dakika 150 rpm’de karanlık ortamda oda sıcaklığında çalkalamaya bırakılmıştır. Formazon bileşikler iyi bir şekilde homojenize olduktan sonra plaklar spektrofotometreye alınarak 570 nm dalga boyunda absorbans değerleri alınmıştır. Absorbans değerlerinin Microsoft Office Excel yazılım programında logaritmik eğim grafikleri çıkarılarak 24., 48. ve 72. saatlerdeki  $\text{IC}_{50}$  değerleri hesaplanmıştır.

### 3.5. Minimum İnhibe Edici Konsantrasyon (MİK) Yöntemi ile Antimikrobiyal Aktivitenin Ölçümü

Çalışmamızda kullanılan bileşiklerin antimikrobiyal etkilerini belirlemek için gram negatif *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, gram pozitif *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 bakteri türleri ile *Candida albicans*



ATCC 90028 ve *Candida tropicalis* maya türleri kullanılmıştır. Bakteriler nutrient agar besiyerinde 37°C’de 18-24 saat süreyle inkübe edilirken, mayalar sabouraud dekstroz agar besiyerinde 24-48 saat süreyle inkübe edilmiştir. Çalışılan bileşiklerin bakteri ve mayalar üzerindeki antimikrobiyal etkileri MİK değerleri saptanarak belirlenmiştir [109, 136].

Bu amaçla bakteriler için Muller Hilton Broth sıvı besiyeri, mayalar için ise RPMI-Mops sıvı besiyeri hazırlanmış ve 96 kuyucuklu plaklara, her kuyucuğa uygun miktarda olacak şekilde eklenmiştir. Antimikrobiyal etkileri test edilecek bileşikler DMSO içinde çözüldükten sonra, besiyeri eklenmiş plaklara dilüsyon yöntemiyle bütün plaklara azalan konsantrasyonda olacak şekilde dağıtım yapılmıştır. McFarland standardı temel alınarak hazırlanmış mikroorganizma kültürlerinin hücre süspansiyonları steril koşullarda sulandırma yapılarak ayarlanmış ve her bir kuyucuğa uygun miktarda aktarılmıştır. Sterilite ve üreme kuyucukları da hazırlanmıştır. Plaklar bakteriler için 24 saat ve mayalar için de 48 saat boyunca etüvde inkübe edildikten sonra her bileşiğin MİK değeri saptanmıştır. Çalışmada ayrıca gentamisin ve flukonazol antibiyotikleri pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

### **3.6. Kaspaz-3 Aktivitesinin Belirlenmesi**

Kaspazlar apoptozda önemli bir rol oynayan aspartat-spesifik sisteinil proteaz ailesinin üyeleridir. Apoptoz normal cenin gelişiminden kanser ve nörodejeneratif hastalıklara kadar birçok fizyolojik ve patolojik olayda rol oynayan bir süreçtir. Bölüm 1.6’da belirtildiği gibi kaspaz-3 apoptozun değerlendirilmesi ve mekanizmasının anlaşılmasında anahtar bir biyo-belirteçdir [137-139].

Tripan mavisi ve MTT deneyleri sonucuna bağlı olarak iki bileşiğin (Bileşik 6 ve 8) A549 ve BEAS-2B üzerine, diğer iki bileşiğin de (Bileşik 4 ve 9) HCT116 ve Hep3B hücre hatları üzerine sitotoksik etkilerine bakılmış ve bu bileşiklerin uygulanması ile ilişkili olarak bu hücre hatlarındaki kaspaz-3 aktivite değerleri saptanmıştır.

Çalışmamızda BioAssay Systems Caspase-3 kiti kullanılmıştır. Bu kitle yapılan ölçümde spesifik bir substrat olan N-Ac-DEVD-AFC kaspaz-3 aktivasyonu yoluyla yüksek floresan özellik gösteren bir ürün oluşturmaktadır. Oluşan bu floresan yoğunluk kaspaz-3 aktivitesiyle orantılıdır.

Kaspaz-3 analizi için; A549, BEAS-2B, Hep3B ve HCT116 hücreleri ile 6 kuyucuklu plaklara 2,5 mL besiyeri ile birlikte ekimleri yapılmıştır. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına sisplatin, Bileşik 6 ve 8 dört farklı dozda (5, 10, 30, 50 µg/mL) uygulanmıştır. Plaklar 72 saat inkübasyona bırakılmış ve 72. saatin sonunda hücreler toplanarak 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Bundan sonraki aşamalarda kullanılan kaspaz kiti sıcaklık değişimlerinden etkilendiğinden tüm örnekler ve uygulanacak maddeler buz içinde tutulmuş ve protokol uygulanmıştır. Sonrasında ELISA okuyucuda 405 nm'de absorbans ölçümü yapılarak, kontrol grubu, bileşik ve sisplatin uygulanmış hücrelerde 72. saatte kaspaz-3 enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler belirlenmiştir. Toplam protein miktarı da Bradford yöntemiyle hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar kullanılarak bileşiklerin etkisine bağlı olarak hücrelerin kaspaz-3 aktiviteleri yüzde olarak hesaplanmış ve grafikler oluşturulmuştur.

### **3.7. Western Blotlama ile Protein İfadesinin Belirlenmesi**

Bu çalışmada protein görüntüleme, semi-dry blotlama tekniği kullanılarak yapılmıştır. Protein analizi için yine kaspaz-3 aktivite tayininde olduğu gibi A549 ve BEAS-2B hücre hatları Bileşik 6 ve 8, Hep3B ve HCT116 hücre hatları Bileşik 4 ve 9 ile muamele edilmiş ve β-Aktin, kaspaz-3 ve p53 proteinlerin ifade düzeyi incelenmiştir.

Her hücre hattında tek doz olarak bileşikler ve sisplatin uygulanmıştır. Uygulanan dozlar MTT sitotoksik aktivite tayini sonuçlarından elde edilen 72. saat IC<sub>50</sub> değerleri baz alınarak belirlenmiştir. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına 5 µg/mL olarak Bileşik 6 ve 8 uygulanmıştır. Bileşik 4, Hep3B ve HCT116 hücre hatlarına 10 µg/mL olarak, Bileşik 9 ise her iki hücre hattına 5 µg/mL olarak uygulanmıştır. Sisplatin bütün hücre hatlarına 5 µg/mL olarak uygulanmıştır.

Çalışmada 6 kuyucuklu plaklara her bir kuyucukta  $1 \times 10^5$  olacak şekilde her çalışılan örnek için 3 kuyucuğa hücre ekimi yapılmış ve ekimi yapılan hücreler bir gün boyunca etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Bir günlük inkübasyon sonunda stok çözeltileri hazırlanan bileşikler hücrelere tek doz olarak uygulanmış ve bileşik uygulanmış plaklardaki hücreler 72 saat süre ile etüvde inkübasyona bırakılmıştır. 72 saat sonunda hücreler Tripsin-EDTA yardımı ile plaklardan toplanarak 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant atılarak hücre peletleri elde edilmiştir.

Daha sonra hücre lizizi yapılmıştır. Bu amaçla, peletlerin üzerine hazırlanan liziz tamponundan 45 µL eklenerek pipetaj yapılmıştır (buzda). Bütün hücreler pipetle alınarak ependorflara aktarılmış (buzda) ve ependorflardaki hücreler 10000 g'de 10 dakika +4°C derecede santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant temiz ependorflara alınmıştır (buzda).

Daha sonra örneklerin Bradford yöntemiyle ELISA'da total proteinleri ölçülmüştür. Protein eşitlemesi için hesaplamalar yapıldıktan sonra hesaplanan oranlarda örneklerden alınarak temiz ependorflara konulmuş ve DPBS ile 10 µL'ye tamamlanmıştır. Ependorflardaki örneklerin üzerine 10 µL yükleme tamponu eklendikten sonra 10 dakika sıcak suya maruz bırakılmış ve 10 dakika sonunda örnekler jel kuyucuklarına 20 µL olacak şekilde yüklenmiştir. Örnekler jel tankında 35 mA'de yaklaşık 40-45 dakika yürütülmüştür.

Daha sonra da Semi-Dry Blotlama ve antikor uygulamasına geçilmiştir. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jeller dikkatli bir şekilde blotlama membranlarının (PVDF membran) üzerine konulmuş ve jel ve membranlar 1,3 amperde 7 dakika boyunca blotlamaya bırakılmıştır. Blotlama işlemi tamamlandıktan sonra membranlar üzerine yıkama işlemi için süt eklenerek 30 dakika 70-80 rpm'de çalkalanmıştır. Çalkalama işlemi sonrası yeniden 5 mL süt eklenmiş ve primer antikorlar uygulanmıştır. Primer antikor uygulaması 24 saat süresince +4°C derecede 70-80 rpm'de gerçekleştirilmiştir. Membranlar DPBS+tween20 çözeltisi eklenerek 30 dakika yıkanmış ve 30 dakika sonunda yıkama solüsyonu döküldükten sonra örneklere bloklayıcı sülle birlikte sekonder antikorlar uygulanarak bir saat inkübasyona bırakılmıştır. Bir saatlik sürenin sonunda yaklaşık bir saat daha DPBS+tween20 çözeltisi ile yıkama yapılmıştır. Yıkama işlemi tamamlanan membranlara ECL eklenerek yaklaşık 5 dakika bekletilmiş ve ECL uygulanmış membranlar görüntüleme cihazına konularak (Licor Image Studio Digits) proteinler görüntülenmiştir.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada Kısım 3.1’de belirtilen 9 farklı benzimidazol türevi Bileşiğin A549, HCT116, Hep3B kanser hücre hatları üzerine ve BEAS-2B sağlıklı hücre hattı üzerine sitotoksik ve antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. Pozitif kontrol grubu olarak sisplatin (50mg/100mL) kullanılmıştır. Bileşiklerin hücre hatları üzerine sitotoksik etkisi Kısım 3.3’de ve Kısım 3.4’de belirtildiği şekilde sırasıyla Tripan mavisi ve MTT yöntemleriyle belirlenmiştir. Bileşiklerin IC<sub>50</sub> değerleri belirlendikten sonra hücre ölüm mekanizmasını aydınlatmaya yönelik olarak kaspaz-3 aktivitesi ve western blotlama yöntemleri uygulanmıştır. Western blotlama ile  $\beta$ -aktin, kaspaz-3 ve p53 gibi proteinlerin ifadeleri değerlendirilmiştir.

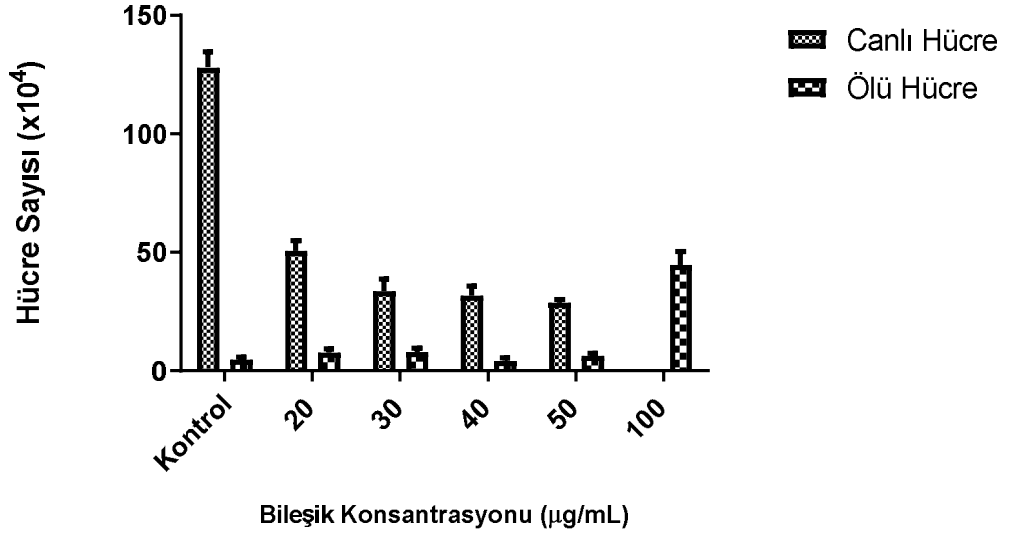
Bu çalışmada kullanılan benzimidazol türevi bileşiklerden Bileşik 2, 3 ve 7’nin daha önce A549 ve BEAS-2B hücre hatları üzerinde sitotoksik ve antimikrobiyal etkileri Apohan ve arkadaşları tarafından 2017 yılında belirlenmiş [109] olduğundan bu çalışmada bu üç bileşiğin Hep3B ve HCT116 hücre hatları üzerine sitotoksik etkisi test edilmiştir.

##### 4.1. Bileşiklerin Hücre Hatları Üzerine Tripan Mavisi Yöntemi İle Belirlenen Sitotoksik Etkileri

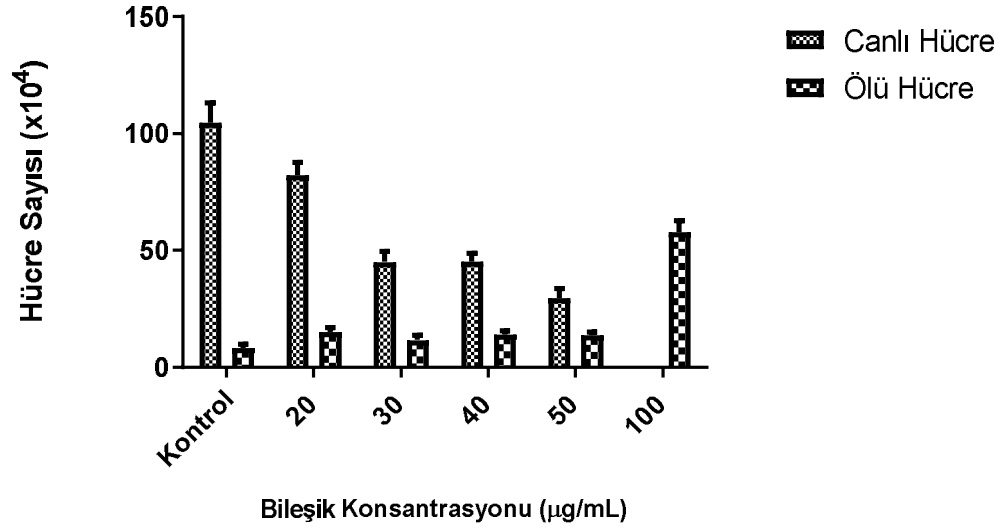
Çalışmada kullanılan bileşikler dört hücre hattına beş doz olarak (20, 30, 40, 50 ve 100  $\mu$ g/mL) uygulanmış ve uygulamadan 24 saat sonra hücreler plaklardaki kuyucuklardan toplanarak sayımlar yapılmıştır. Bileşiklerin tripan mavisi yöntemi ile hücreler üzerindeki hücre sayısına bağlı değişimlerini gösteren grafikler aşağıda verilmiştir (Şekil 4.1-4.9).

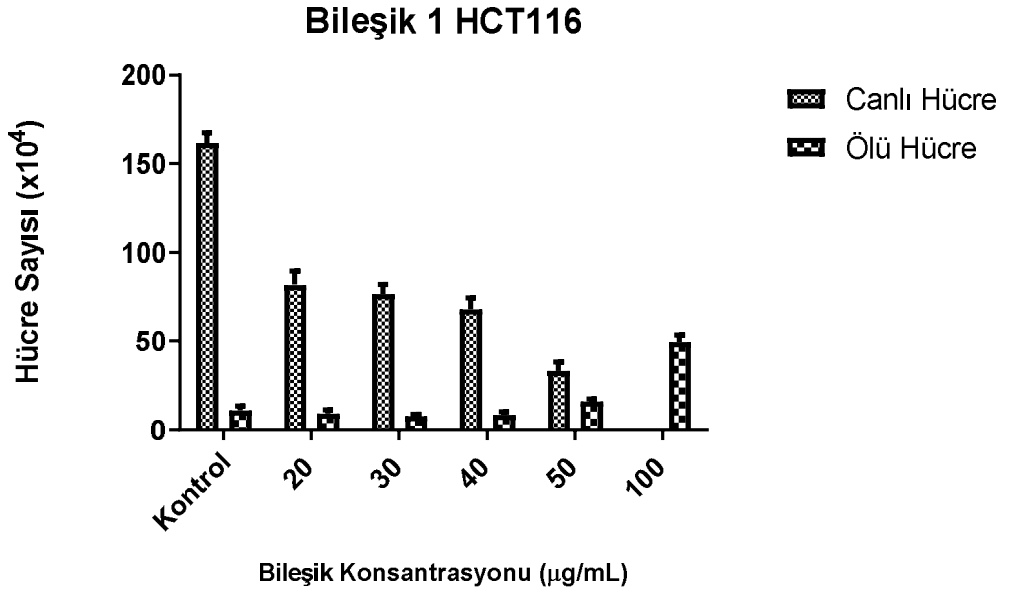
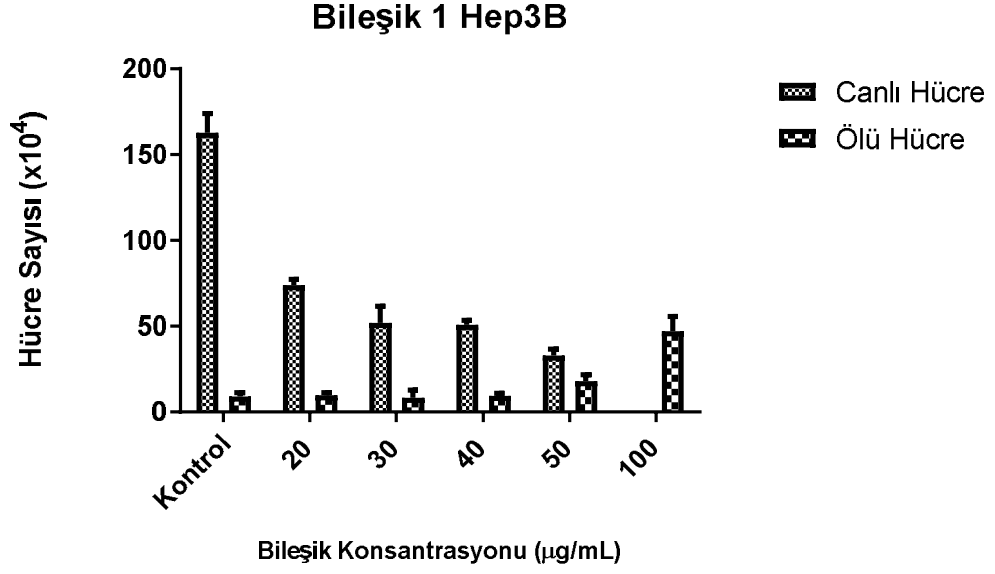
Bileşik 1’in A549, BEAS-2B, Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi Şekil 4.1’de verilmiştir. Bu bileşiğin dört hücre hattı üzerine de ilk doz olan 20  $\mu$ g/mL’den itibaren etki ettiği görülmektedir. Son doz olarak uygulanan 100  $\mu$ g/mL’de canlı hücre gözlenmemiştir.

### Bileşik 1 A549



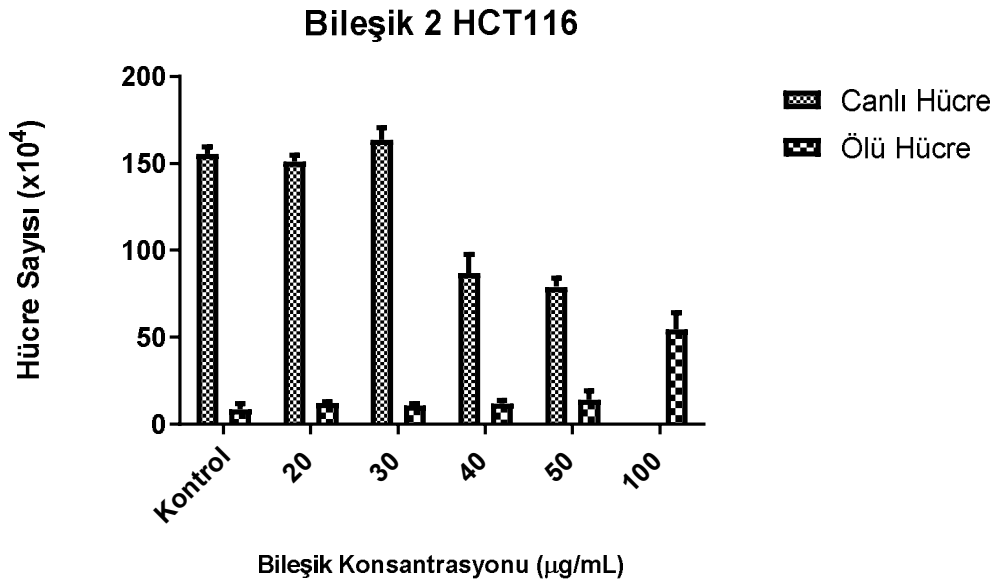
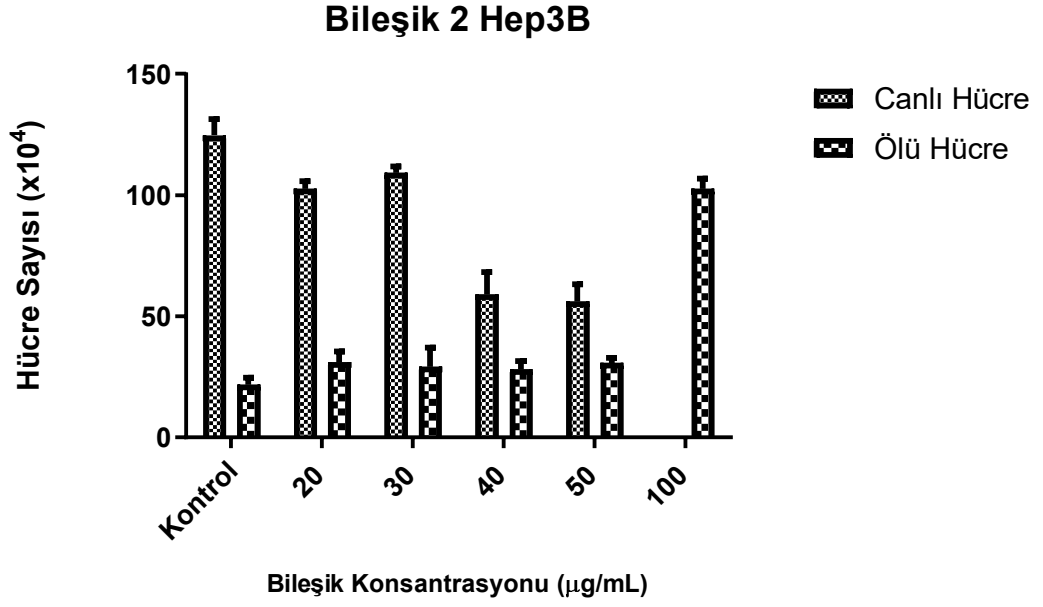
### Bileşik 1 BEAS-2B





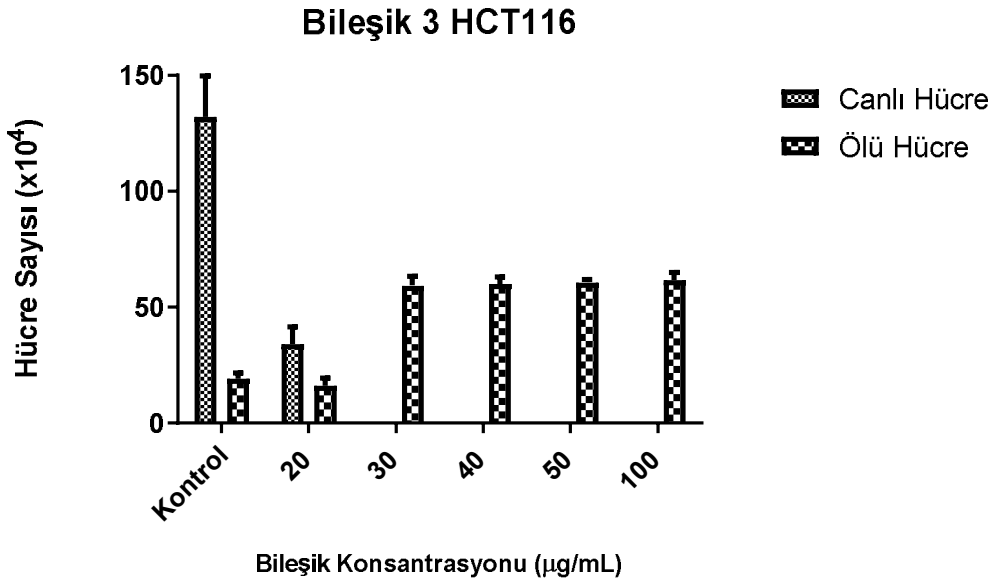
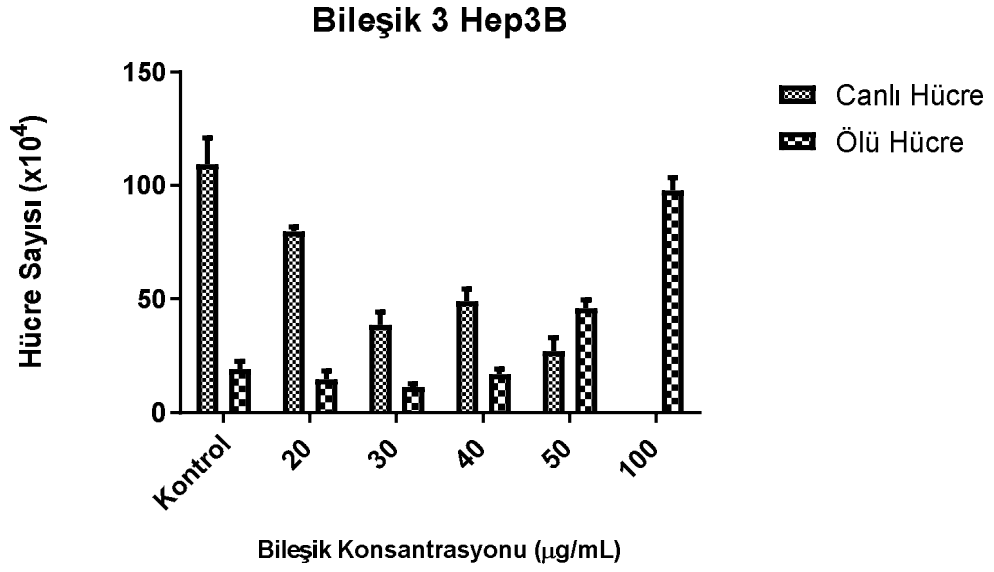
**Şekil 4.1.** Bileşik 1'in A549, BEAS-2B, Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Bileşik 2'nin Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine özellikle 40  $\mu\text{g/mL}$  dozdan itibaren belirgin bir şekilde etkisi görülmüştür. 100  $\mu\text{g/mL}$  dozda her iki hücre hattında da canlı hücreye rastlanılmamıştır (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2.** Bileşik 2'nin Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Bileşik 3'ün Hep3B ve HCT116 hücre hatları üzerine ilk doz olan 20 µg/mL'den itibaren sitotoksik etkisi görülmüştür. Bu bileşiğin HCT116 hücre hattında 30 µg/mL dozdan itibaren canlı hücre bırakmaması belirgindir (Şekil 4.3).

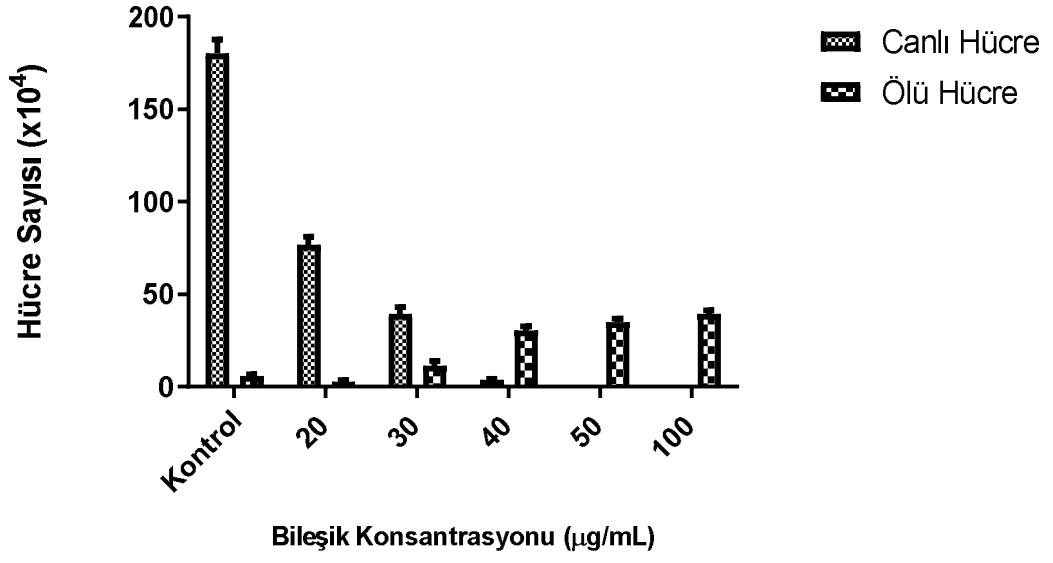


**Şekil 4.3.** Bileşik 3'ün Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

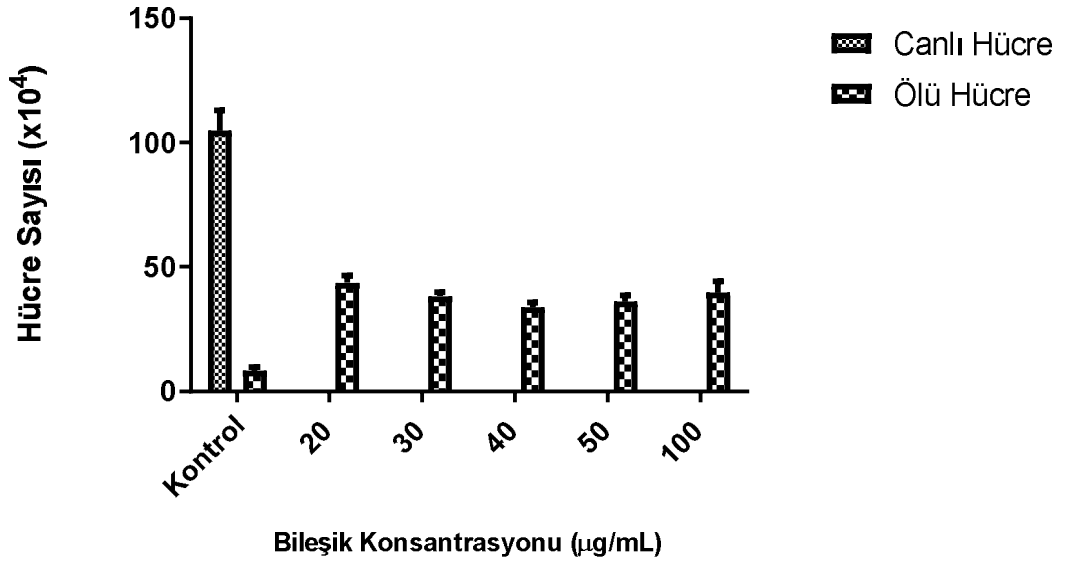
Şekil 4.4'de Bileşik 4'ün dört hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi görülmektedir. Bu bileşiğin özellikle 20-30 µg/mL doz aralığında çok etkili olduğu gözlenmiştir.

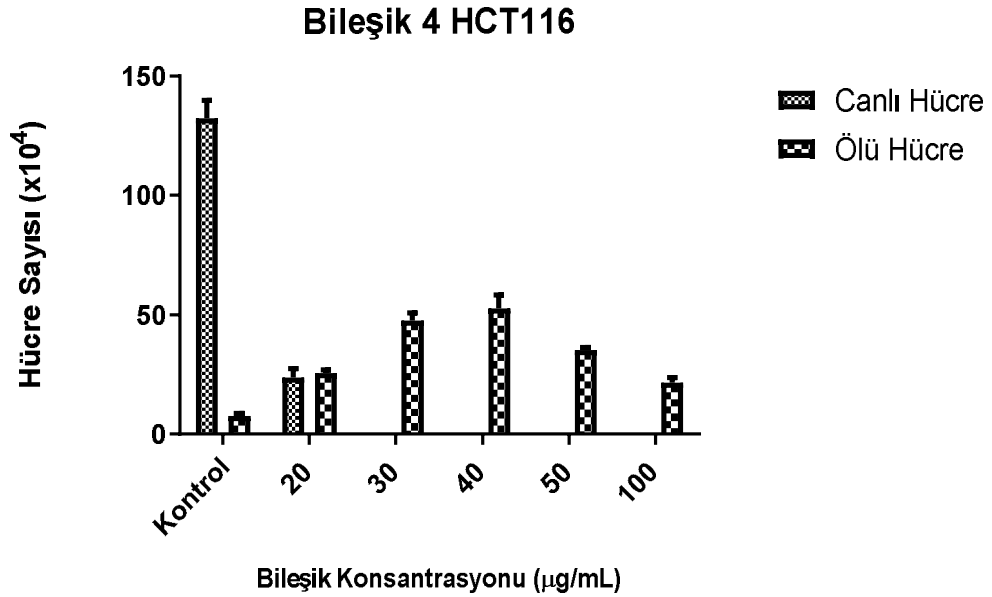
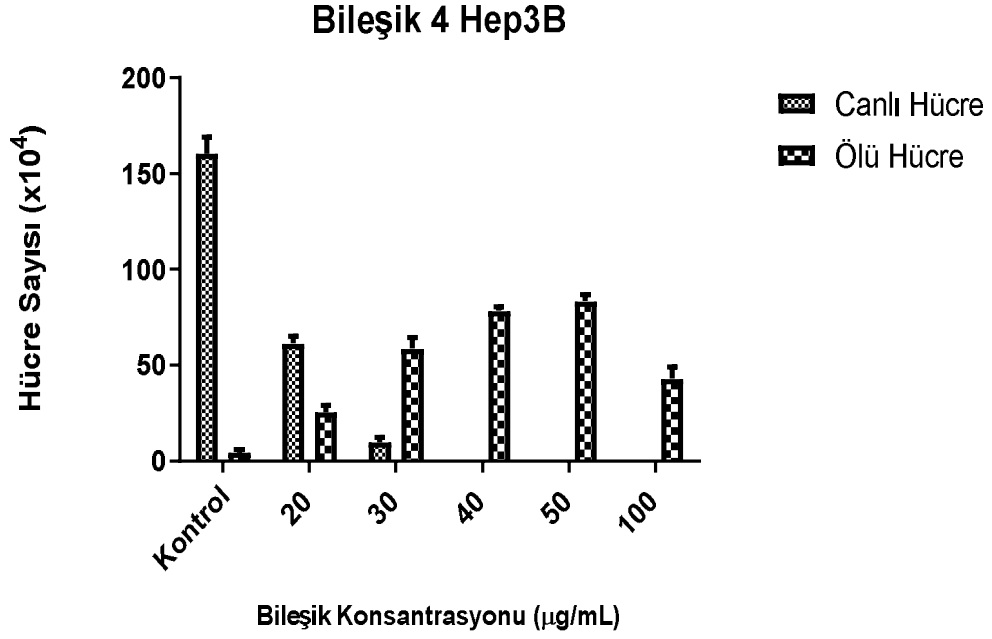


### Bileşik 4 A549



### Bileşik 4 BEAS-2B

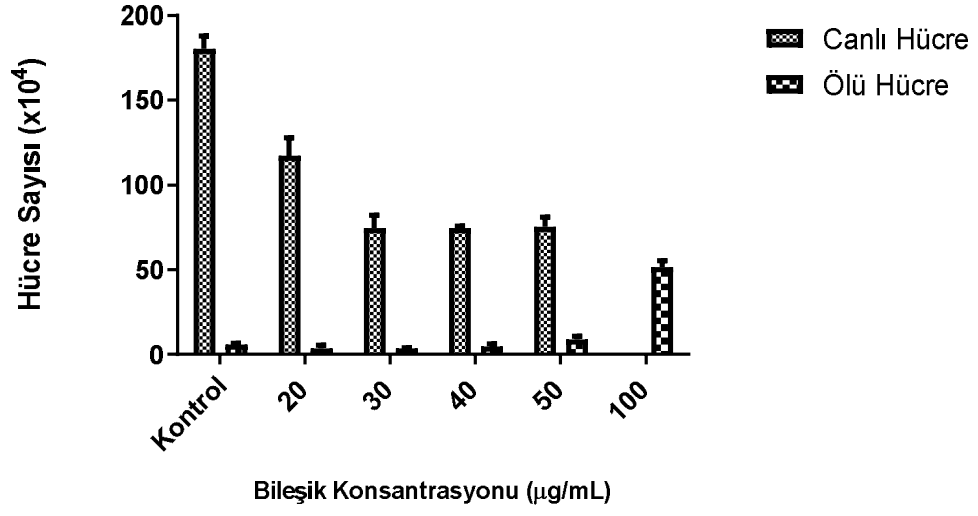




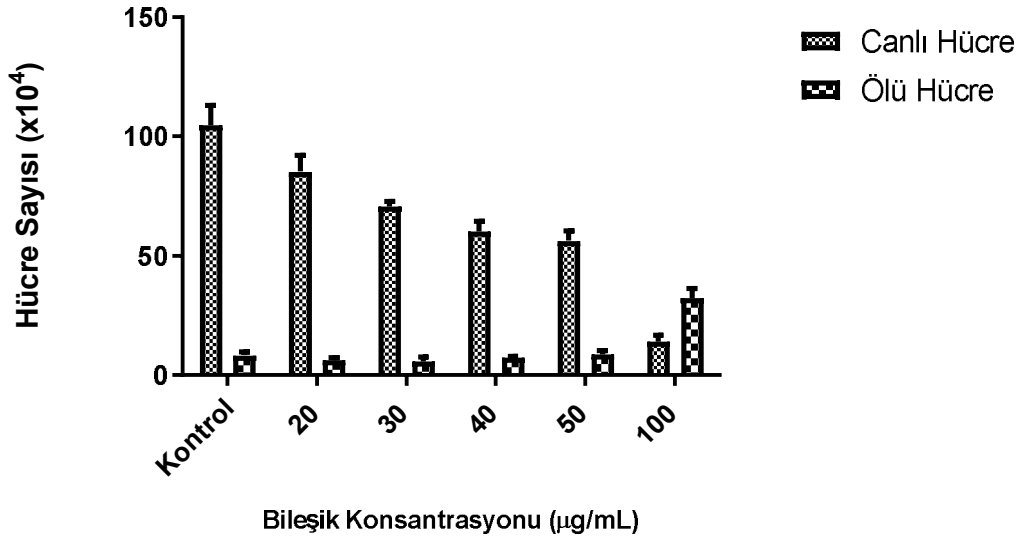
**Şekil 4.4.** Bileşik 4'ün A549, BEAS-2B, Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

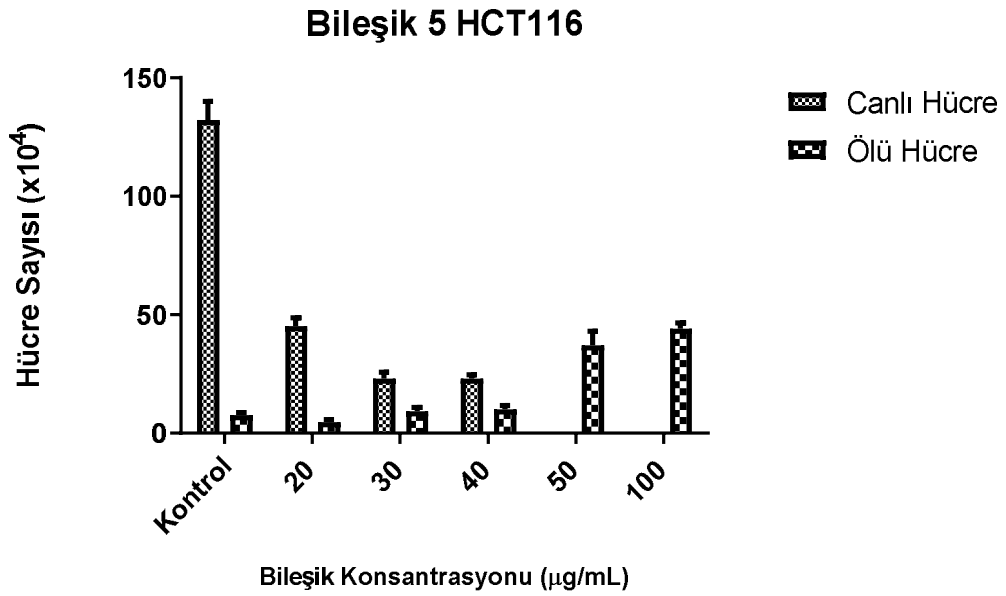
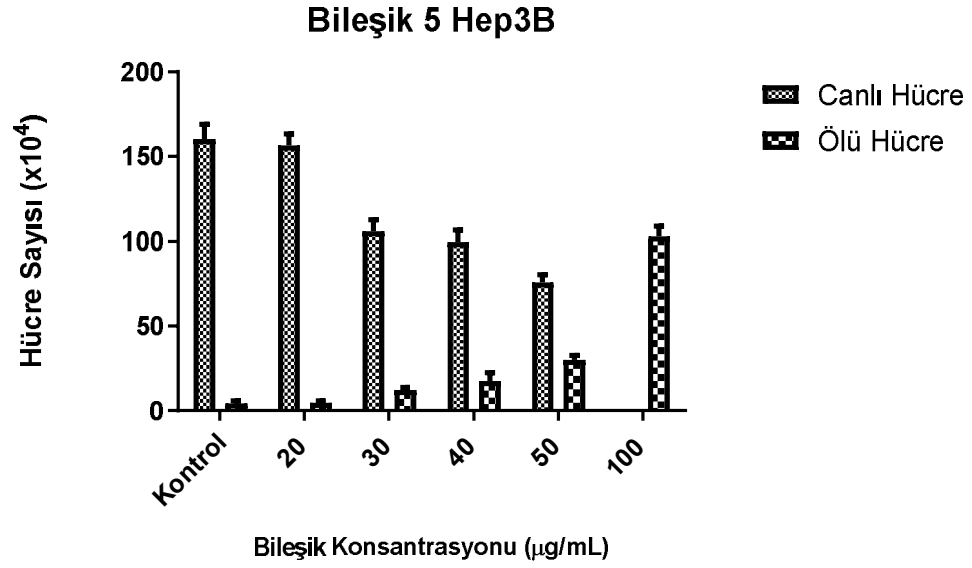
Şekil 4.5'de Bileşik 5'in dört hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi verilmiştir. Bu bileşiğin dört hücre hattından özellikle HCT116 hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

### Bileşik 5 A549



### Bileşik 5 BEAS-2B

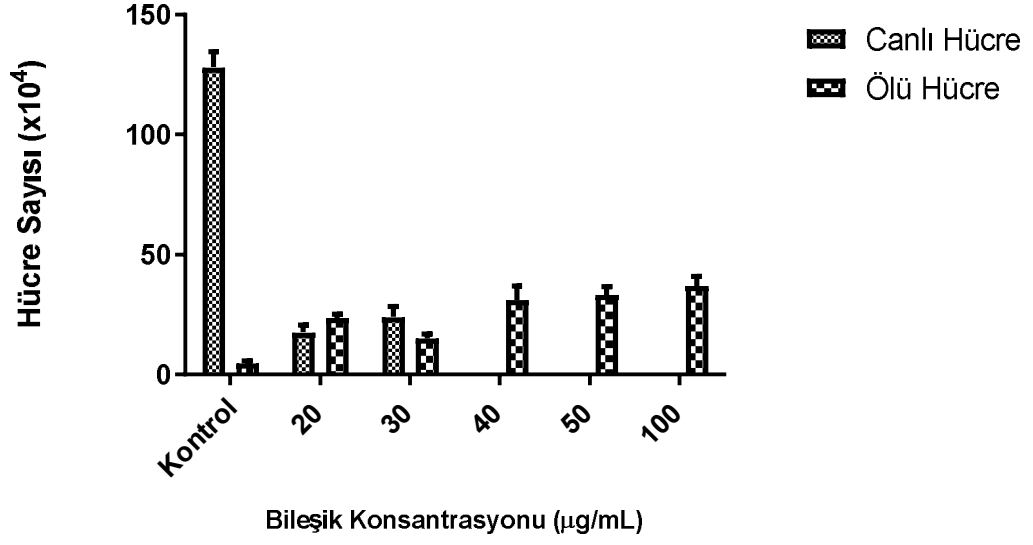




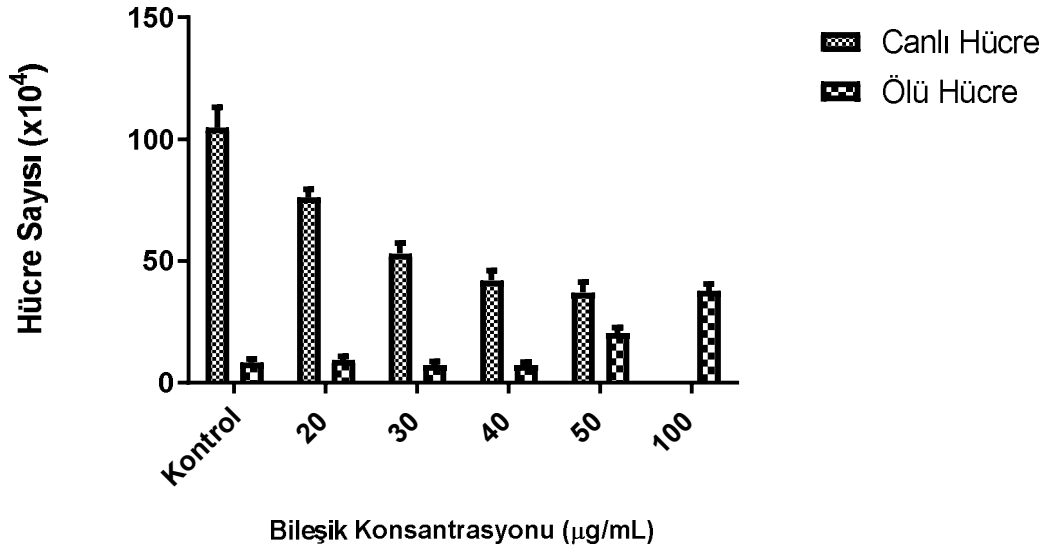
**Şekil 4.5.** Bileşik 5'in A549, BEAS-2B, Hep3Bve HCT116 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

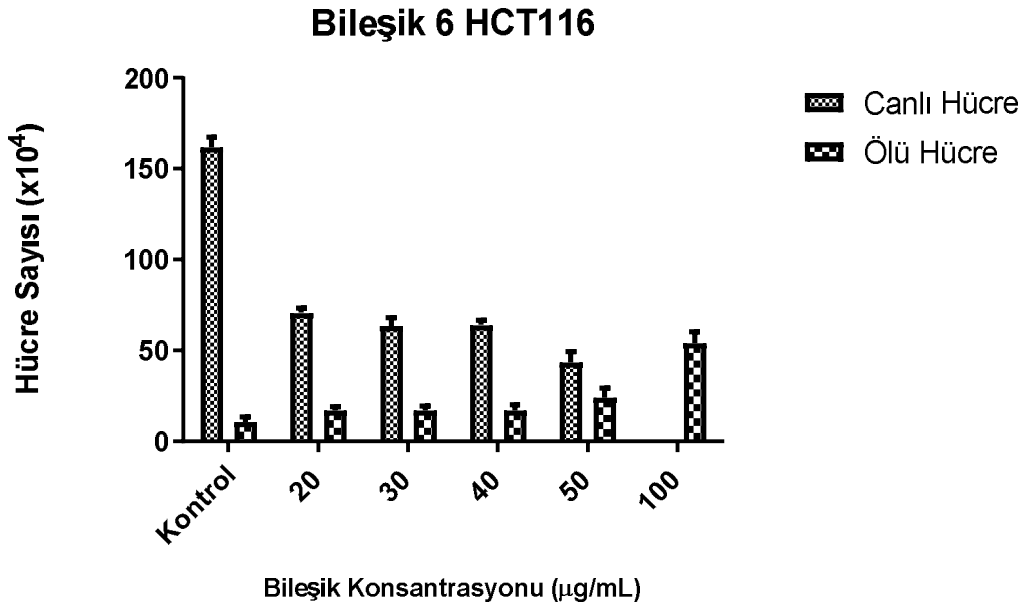
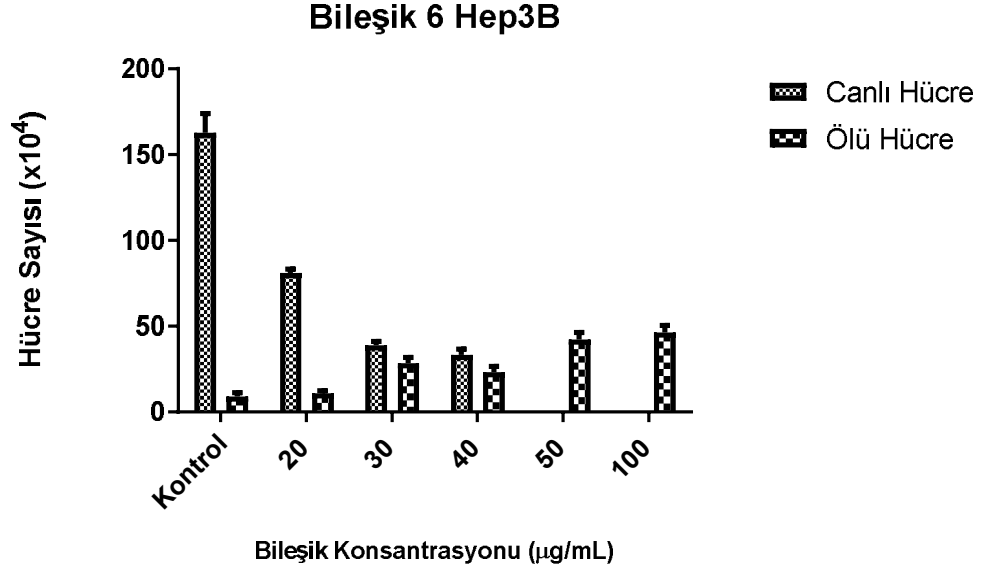
Bileşik 6 dört hücre hattı üzerine ilk dozdan itibaren sitotoksik etki yapmıştır. Özellikle A549 üzerindeki sitotoksik etkisi ilk doz olan 20 µg/mL'den itibaren çok belirgindir (Şekil 4.6).

### Bileşik 6 A549



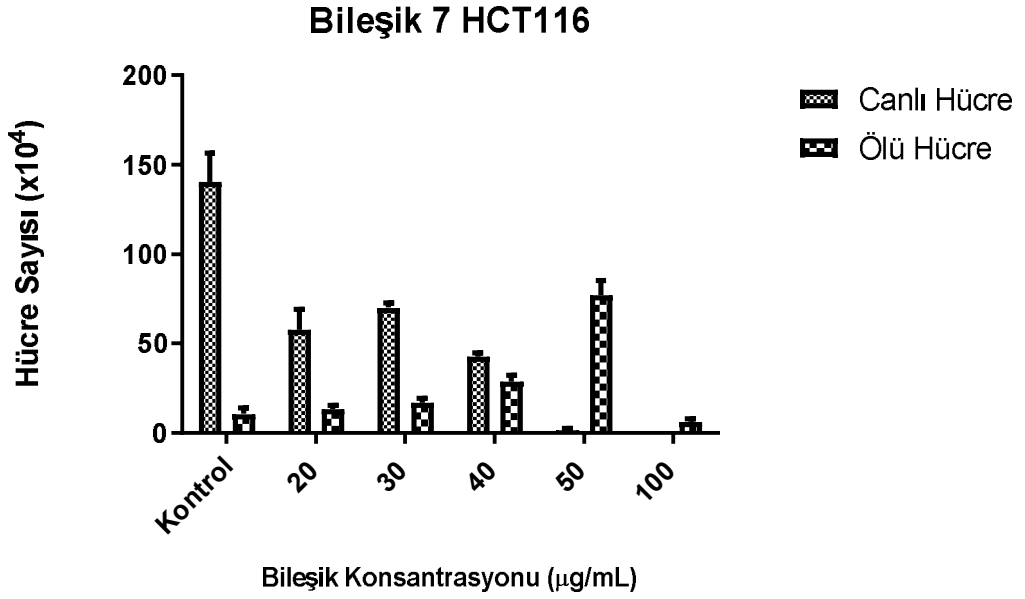
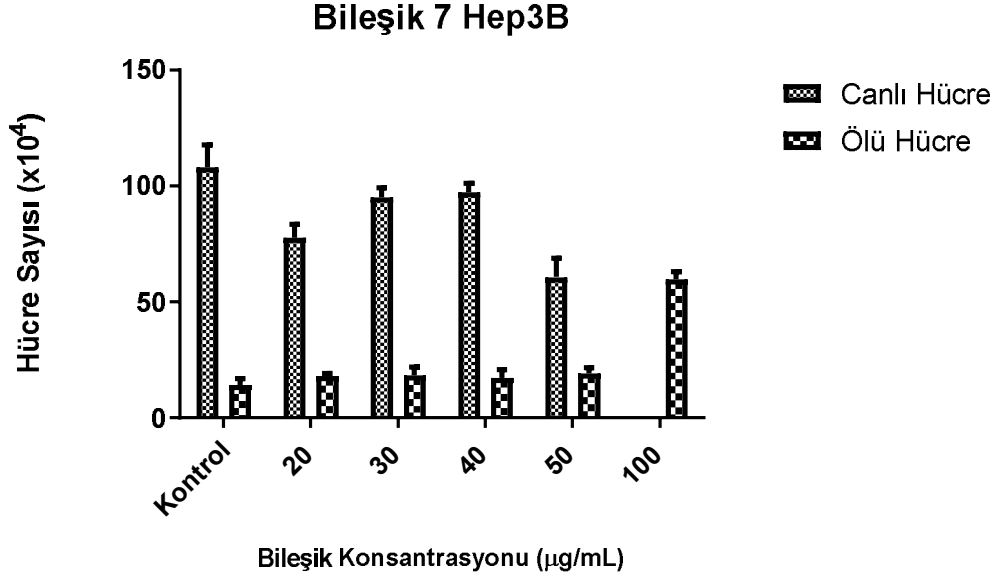
### Bileşik 6 BEAS-2B





**Şekil 4.6.** Bileşik 6'nın A549, BEAS-2B, Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Şekil 4.7'de Bileşik 7'nin Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri verilmiştir. Bu bileşik Hep3B hücrelerine kıyasla HCT116 hücreleri üzerine belirgin yüksek bir sitotoksik etki yapmıştır.



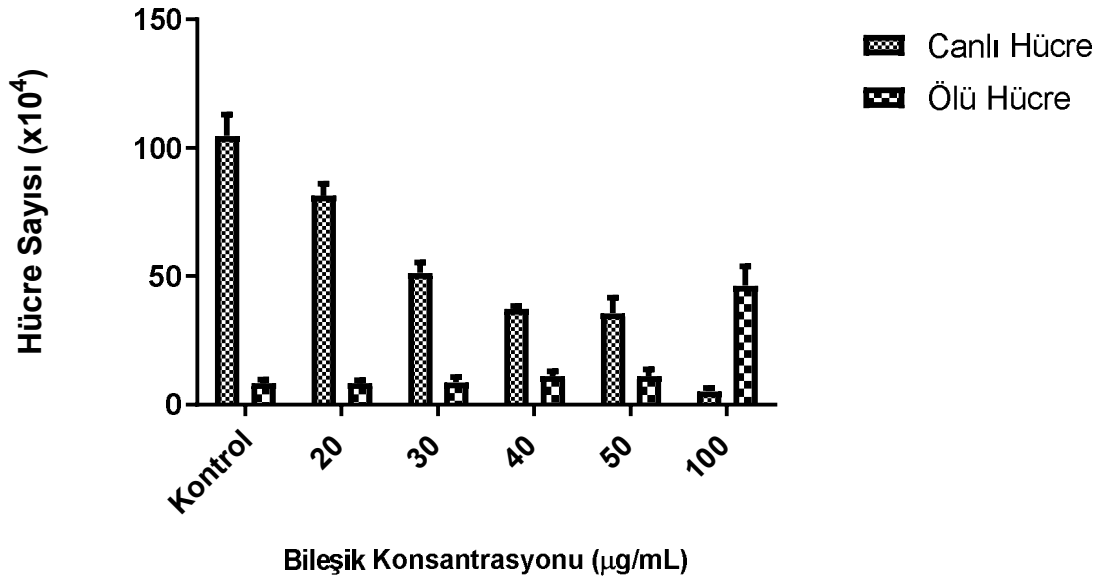
Şekil 4.7. Bileşik 7'nin Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Şekil 4.8'de, Bileşik 8'in dört hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi gösterilmiştir. Bu bileşiğin dört hücre hattında benzer sitotoksik etkiye sahip olduğu görülmektedir. 100 µg/ml doz uygulamasında canlı hücre gözlenmemiştir.

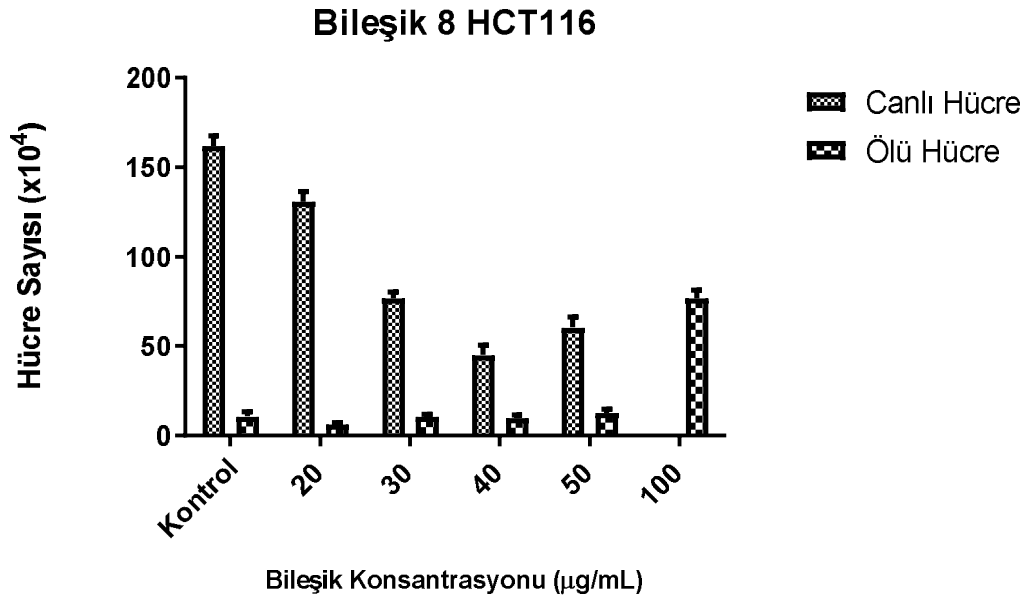
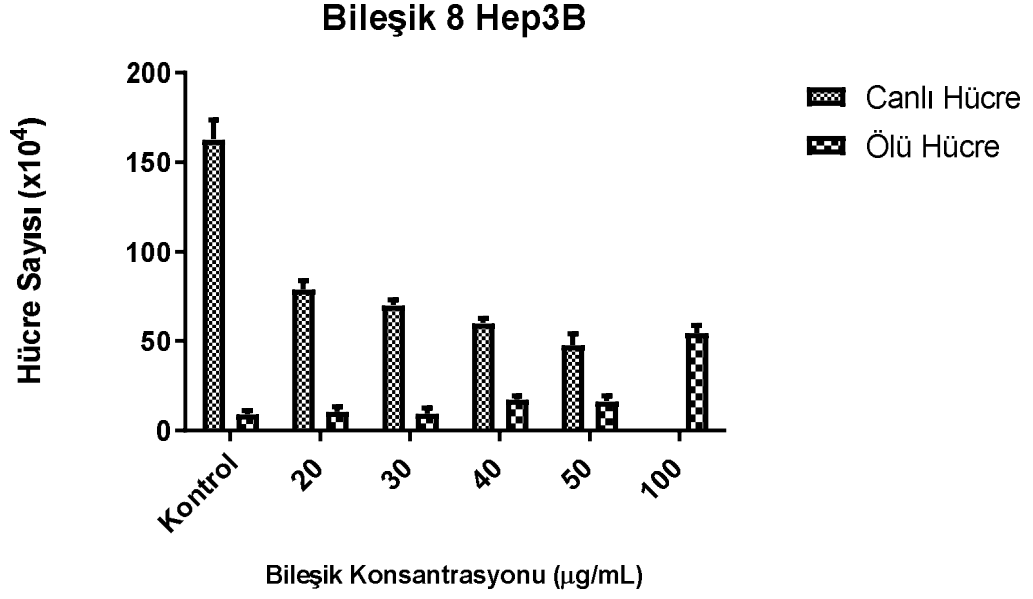
### Bileşik 8 A549



### Bileşik 8 BEAS-2B



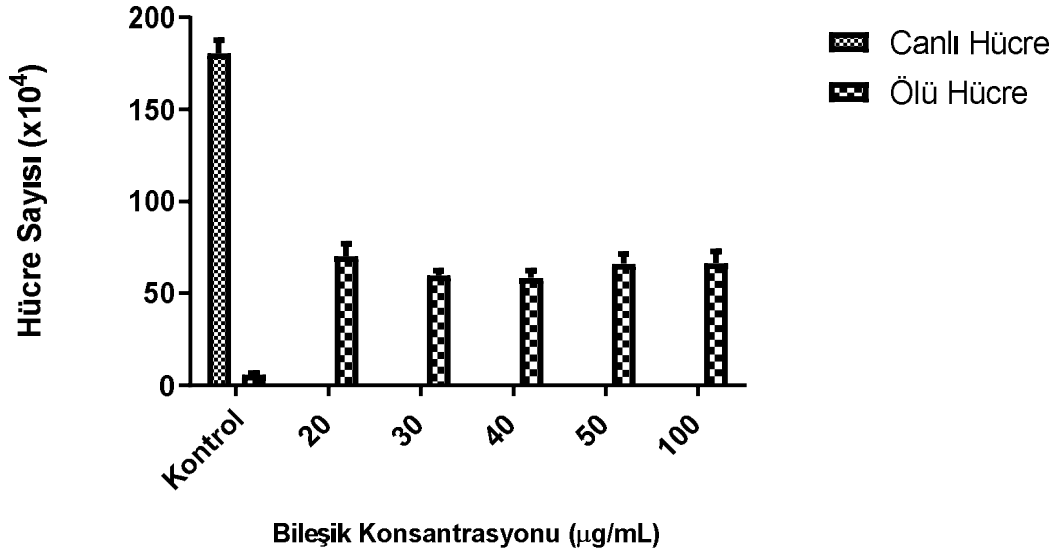




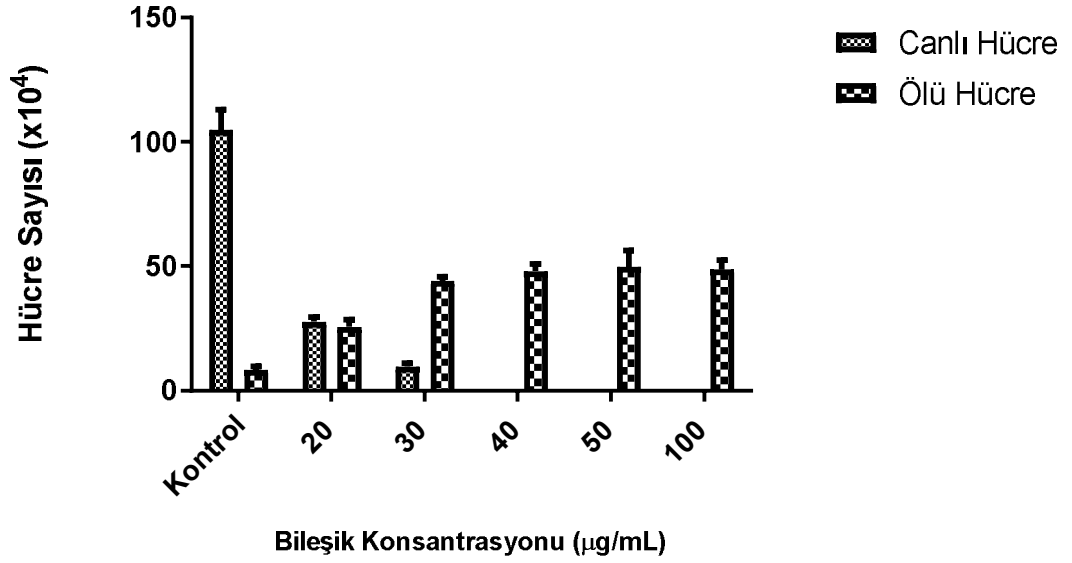
**Şekil 4.8.** Bileşik 8'in A549, BEAS-2B, Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

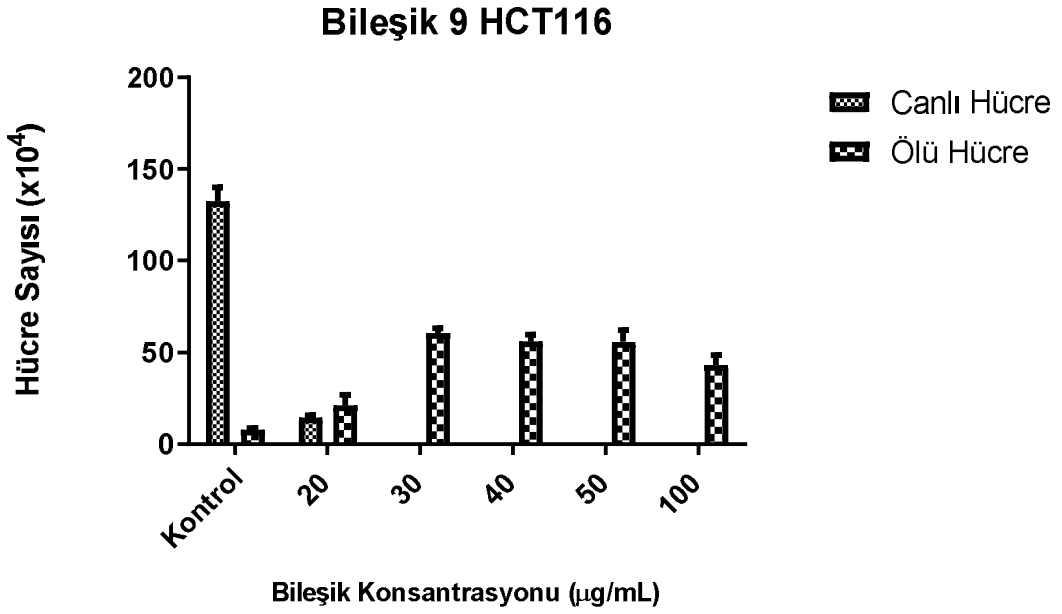
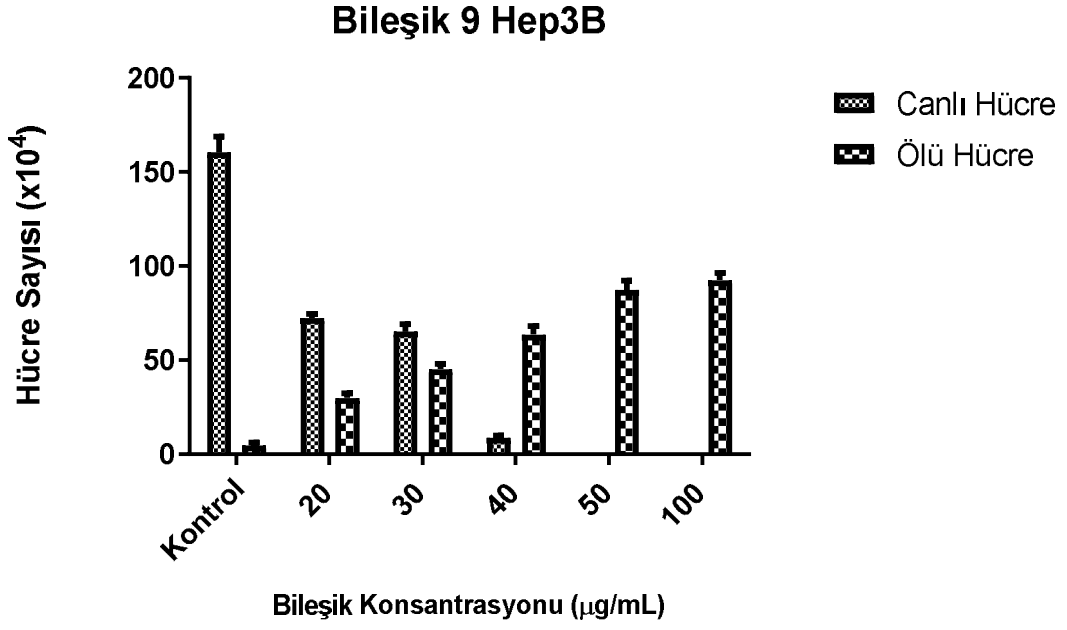
Şekil 4.9'da görüldüğü gibi, Bileşik 9'un dört hücre hattı üzerine oldukça etkilidir. Özellikle A549 ve HCT116 hücreleri üzerine ilk doz olan 20 µg/mL'den itibaren yüksek etki yapmıştır.

### Bileşik 9 A549



### Bileşik 9 BEAS-2B



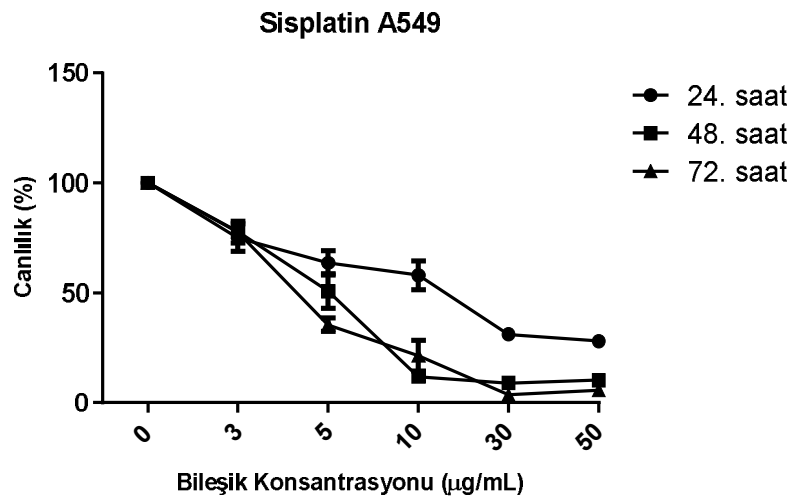


Şekil 4.9. Bileşik 9'un A549, BEAS-2B, Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine etkisi

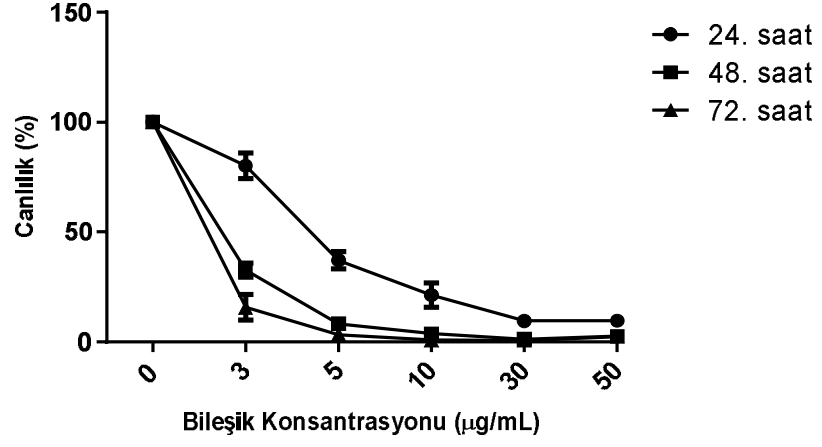
## 4.2. Bileşiklerin Hücre Hatları Üzerine MTT Yöntemi İle Belirlenen Sitotoksik Etkileri ve IC<sub>50</sub> Değerleri

Bileşiklerin, tripan mavisi yöntemi ile sitotoksik etkileri izlenmiş ve çıkan sonuçlar doğrultusunda MTT yönteminde uygulanacak dozlar belirlenmiştir. MTT yöntemi ile bileşiklerin hücre hatları üzerine sitotoksik etkilerinin zamana bağlı olarak değişimi saptanmıştır. MTT çalışmaları sonucunda bileşiklerin ve kontrol olarak kullandığımız sisplatinin hücreler üzerine sitotoksik etkileri hem grafik olarak hem de IC<sub>50</sub> değerleri olarak oluşturulmuştur. Bileşiklerin ve sisplatinin 24, 48 ve 72 saat sonunda hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin grafiksel dökümleri ve IC<sub>50</sub> değerleri aşağıda verilmiştir (Şekil 4.10-4.19 ve Çizelge 4.1-4.2).

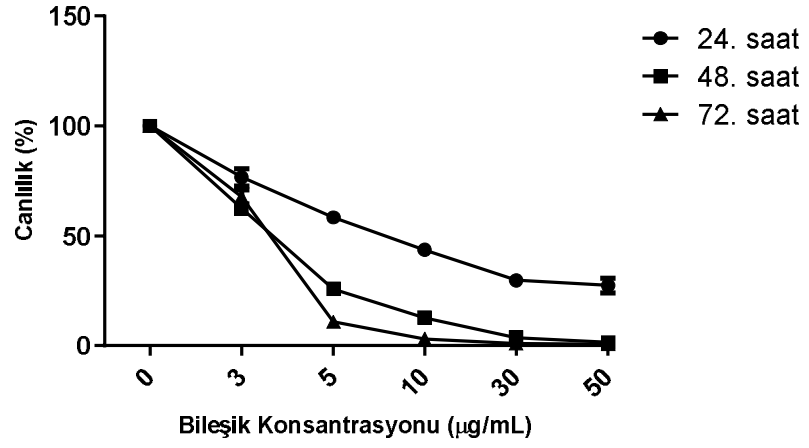
Şekil 4.10'da sisplatinin konsantrasyon ve zaman bağlı olarak hücre hatları üzerine yaptığı sitotoksik etki canlılık değişimine bağlı olarak izlenmektedir. Sisplatinin 24., 48. ve 72. saatlerdeki IC<sub>50</sub> değerleri A549 hücre hattı için 16, 5.10 ve 4.31 µg/mL ve BEAS-2B hücre hattı için 4.40, 2.22 ve 1.78 µg/mL olarak saptanırken Hep3B hücre hattı için 7.87, 3.68 ve 3.62 µg/mL ve HCT116 hücre hattı için de 5.63, 2.16 ve 1.95 µg/mL olarak saptanmıştır (Çizelge 4.1-4.2).

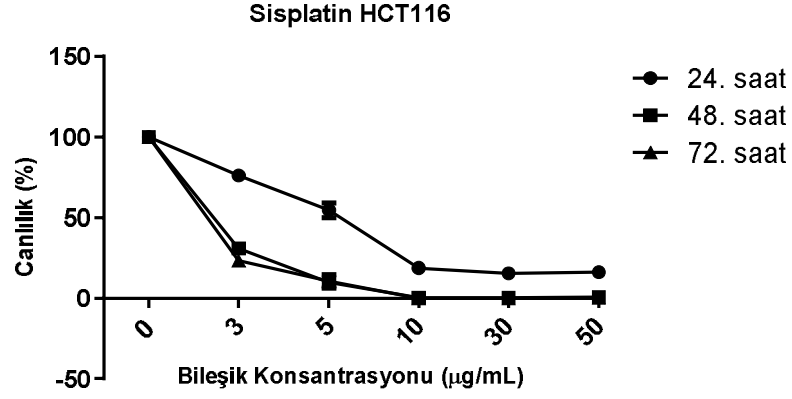


Sisplatin BEAS-2B



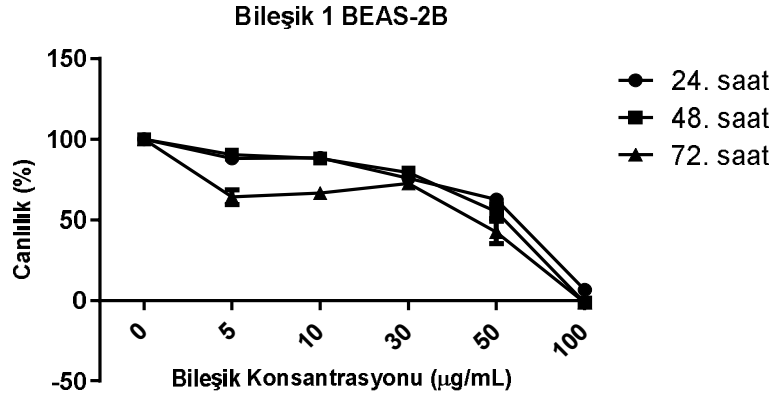
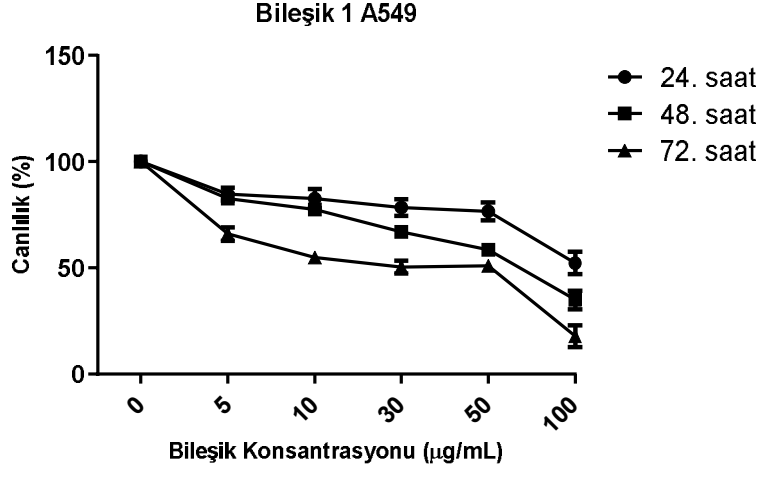
Sisplatin Hep3B

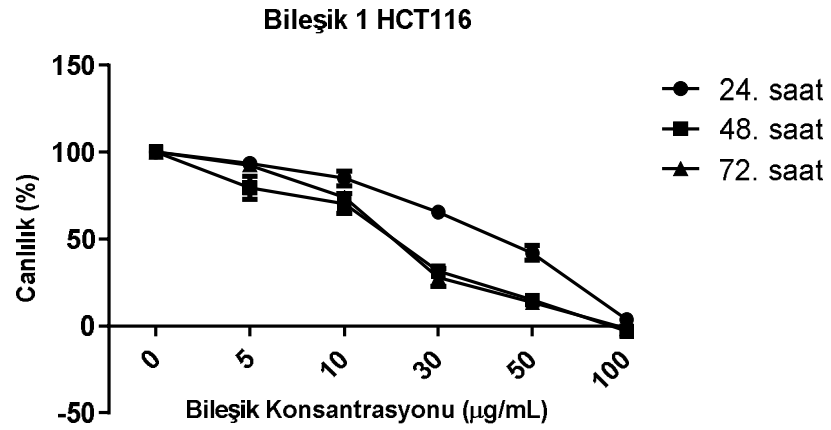
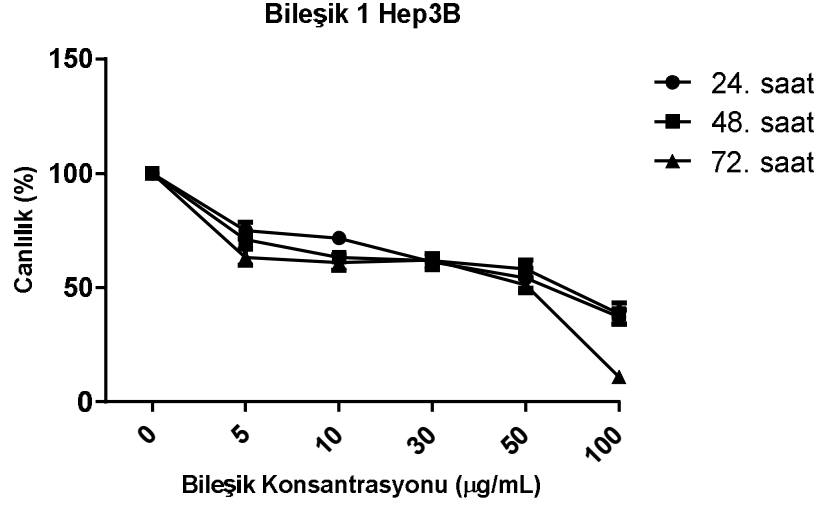




**Şekil 4.10.** Sisplatinin A549, BEAS-2B, Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

Şekil 4.11’de Bileşik 1’in dört hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi görülmektedir. Çalışmaya bağlı olarak IC<sub>50</sub> sitotoksik etki değerleri de saptanmıştır. A549 hücre hattında IC<sub>50</sub> değerleri 48. saat için 68.23 µg/mL ve 72. saat için 51.66 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Diğer hücre hatları üzerindeki etki değerleri 24., 48. ve 72. saat için sırasıyla BEAS-2B hücre hattında 61.21, 54.59 ve 44.84 µg/mL olarak, Hep3B hücre hattında 62.46, 70.95 ve 51.37 µg/mL olarak ve HCT116 hücre hattı için de 43.22, 20.53 ve 20.39 µg/mL olarak saptanmıştır (Çizelge 4.1-4.2).

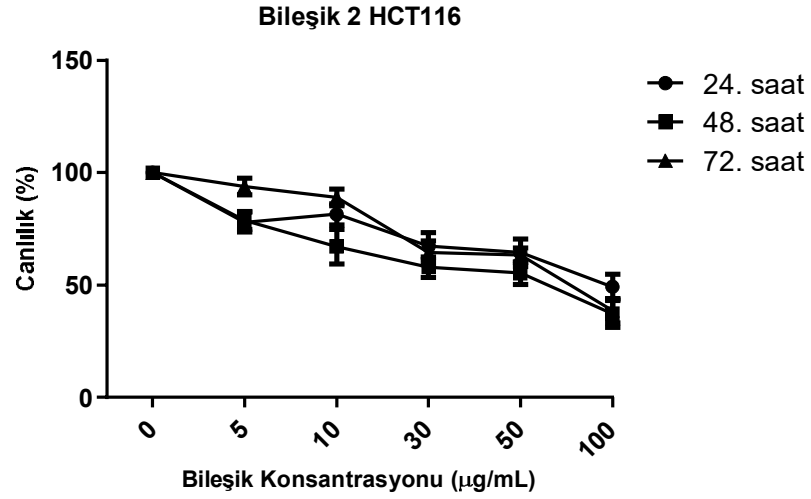
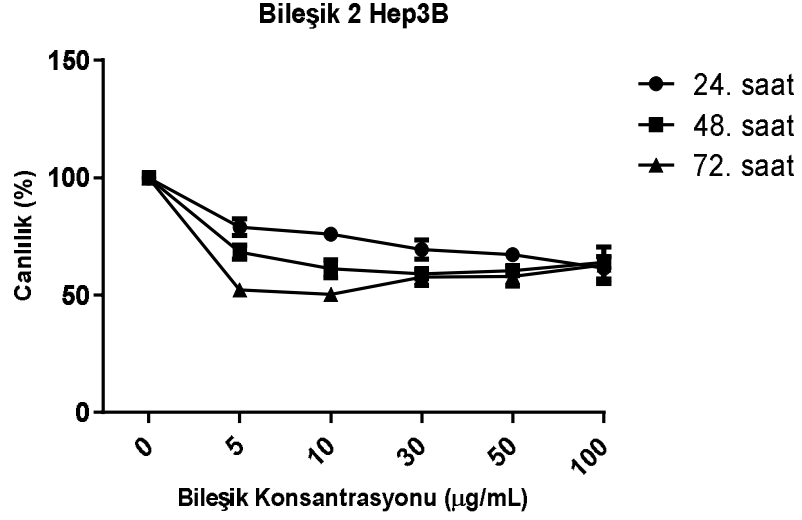




**Şekil 4.11.** Bileşik 1'in A549, BEAS-2B, Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

Bileşik 2'nin Hep3B ve HCT116 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi Şekil 4.12'de görülmektedir. Hep3B hücre hattı için 24., 48. ve 72. saatlerde  $IC_{50}$  değerleri ölçülemezken, HCT116 hücre hattı için  $IC_{50}$  değerlerin sırasıyla 97.85, 65.01 ve 77.11 µg/mL olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.1).

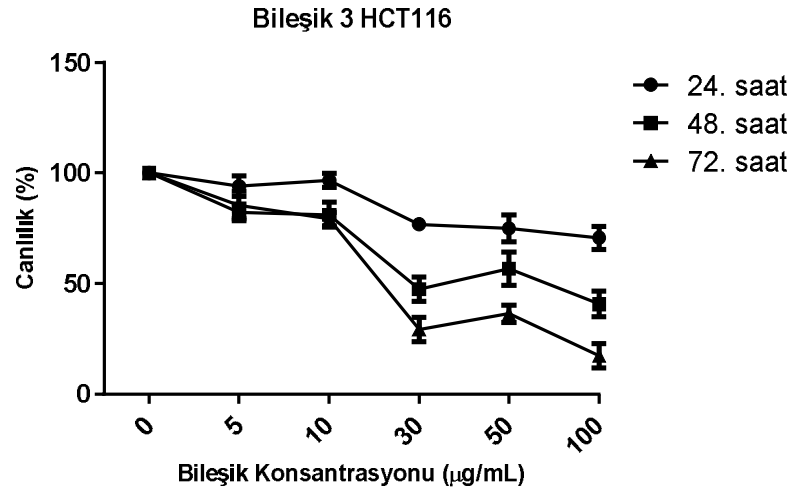
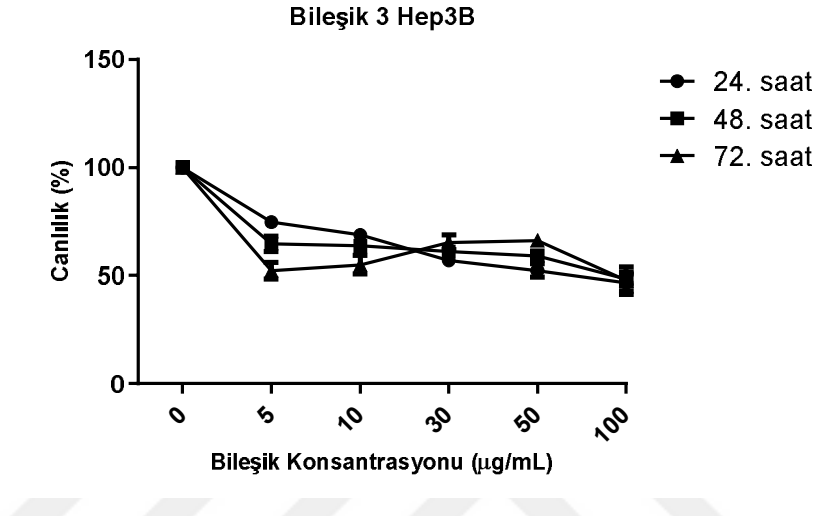




**Şekil 4.12.** Bileşik 2'nin Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

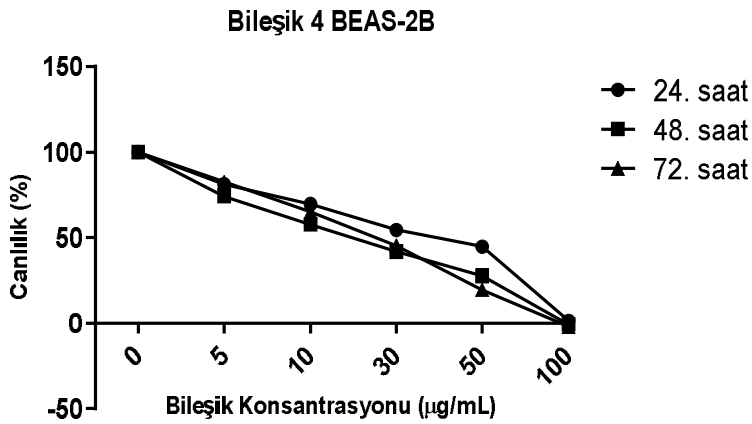
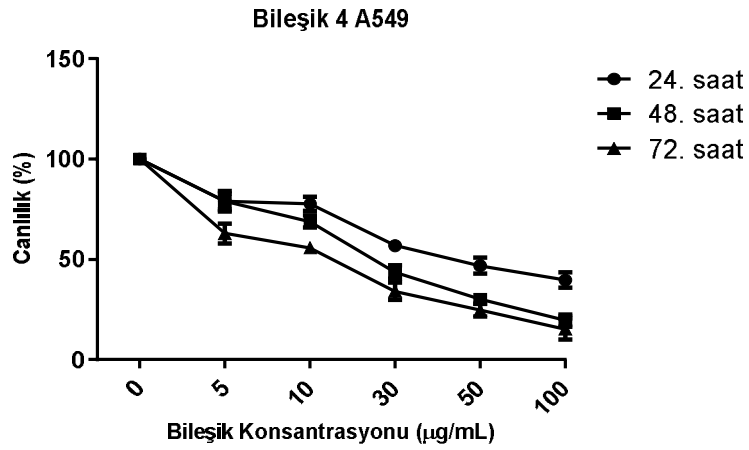
Şekil 4.13'de Bileşik 3'ün Hep3B ve HCT116 hücre hatları üzerine 24., 48. ve 72. saatlerde sitotoksik etki değişimi canlılık değişimine bağlı olarak izlenmiştir. Bileşik 3'ün Hep3B hücre hattı üzerine IC<sub>50</sub>değerleri sırasıyla 70.71, 92.62 ve 93.81 µg/mL olarak

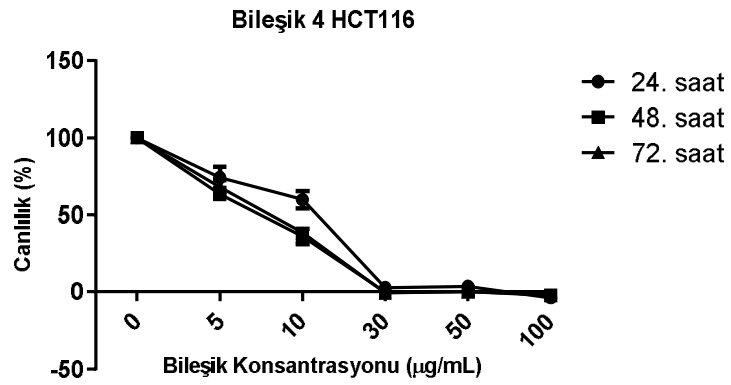
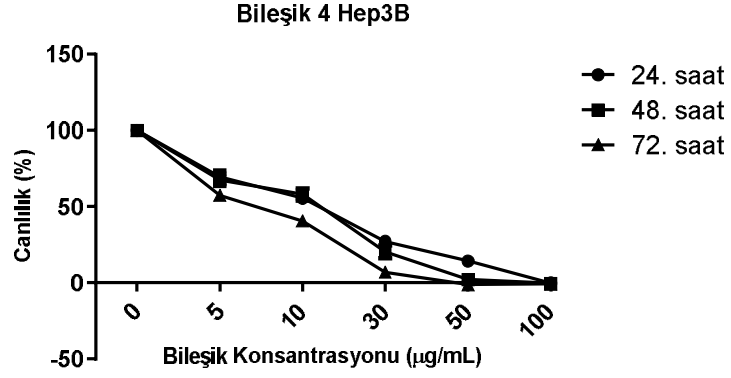
saptanırken, HCT116 hücre hattı üzerine 24. saatte IC<sub>50</sub> değeri tespit edilememiştir. 48. ve 72. saatlerde ise IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 70.78 µg/mL ve 21.68 µg/mL olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1).



**Şekil 4.13.** Bileşik 3'ün Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

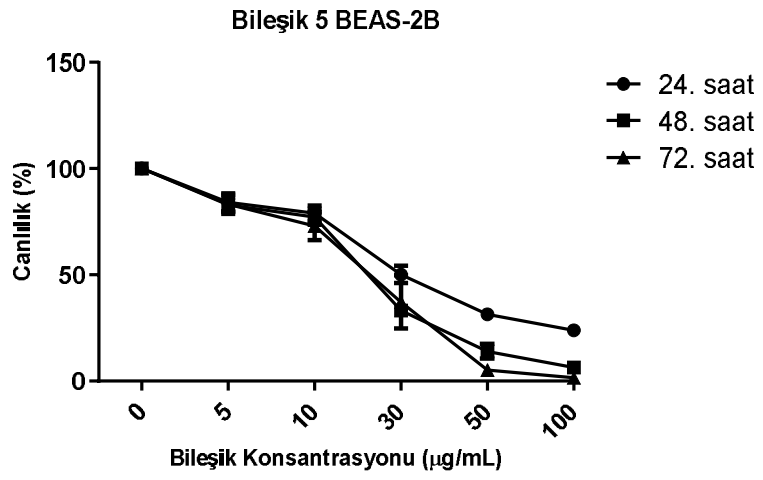
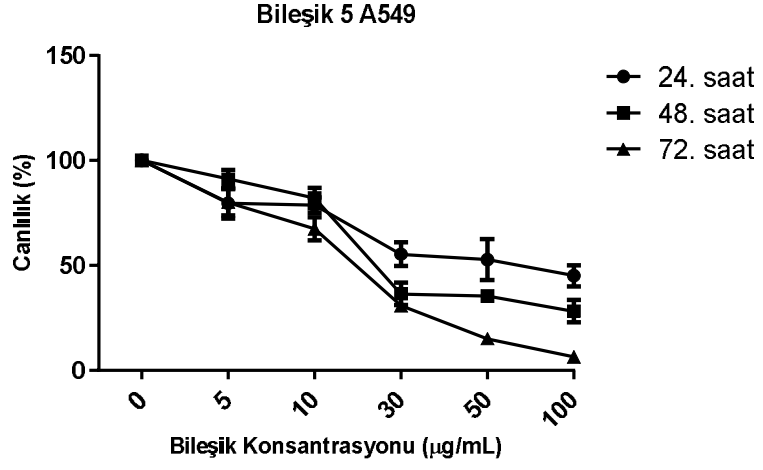
Bileşik 4'ün dört hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi Şekil 4.14'de görülmektedir. Bileşik 4'ün özellikle Hep3B ve HCT116 hücre hatları üzerine 72. saat IC<sub>50</sub> değerleri, bu bileşiğin bu hücre hatları üzerinde oldukça düşük dozlarda bile etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bileşik 4'ün Hep3B ve HCT116 hücre hatları için 72. saat IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 7.2 µg/mL ve 8.05 µg/mL'dir. A549 ve BEAS-2B hücre hatları için ise 72. saat IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 15.12 µg/mL ve 25.39 µg/mL olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1-4.2).

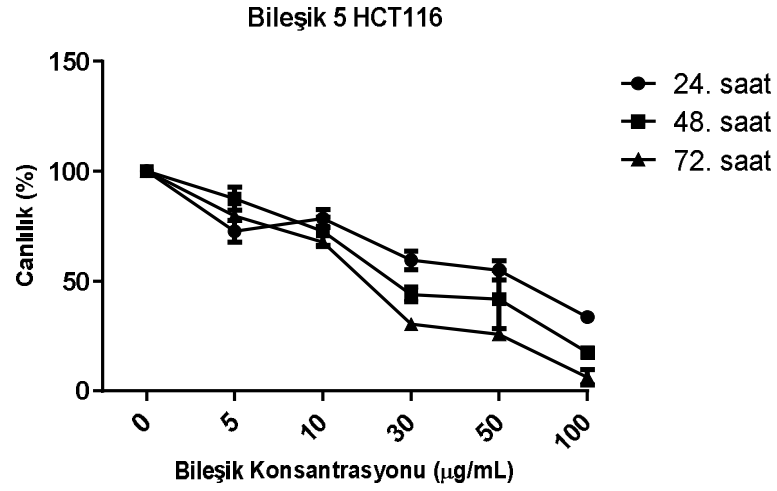
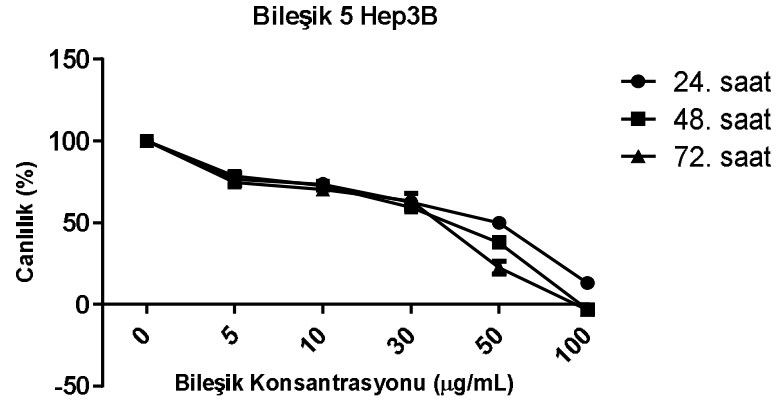




**Şekil 4.14.** Bileşik 4'ün A549, BEAS-2B, Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

Bileşik 5'in dört hücre hattı üzerindeki zamana bağlı sitotoksik etkisi Şekil 4.15'de verilmiştir. Bileşik 5'in HCT116 ve A549 hücre hatları üzerine 72. saat  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla 19.54 µg/mL ve 19.47 µg/mL olarak belirlenmiştir. Diğer iki hücre hattı üzerine elde edilen  $IC_{50}$  değerleri bu değerlerden daha yüksektir (Çizelge 4.1-4.2).

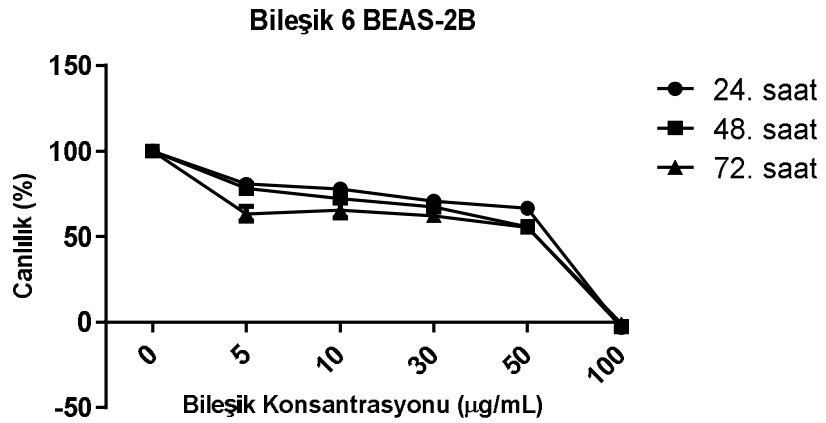
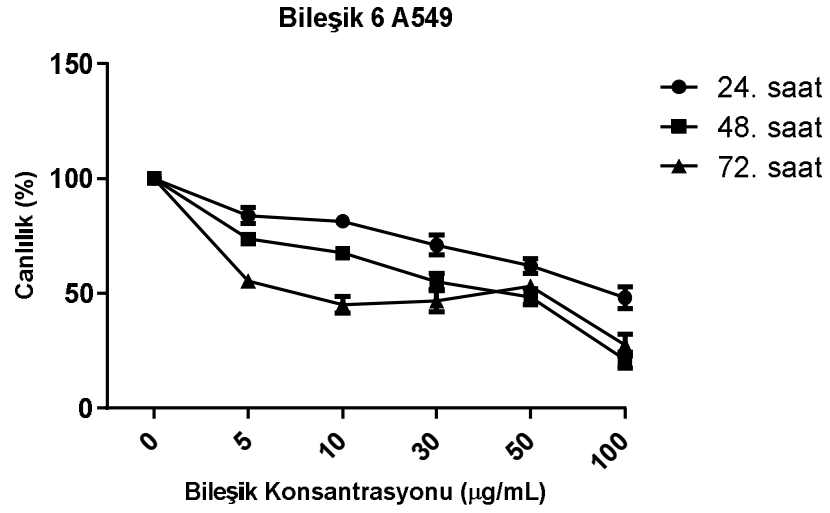


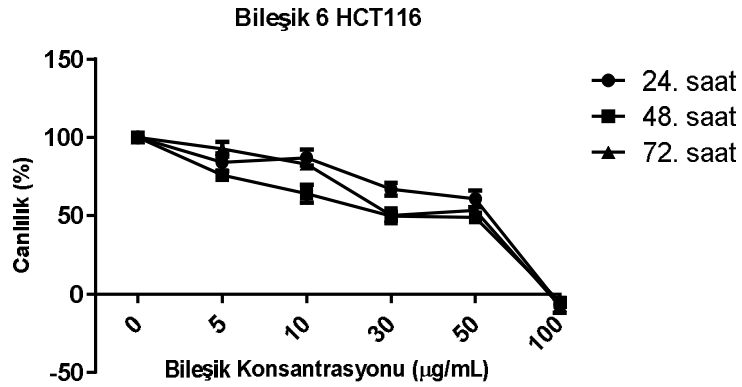
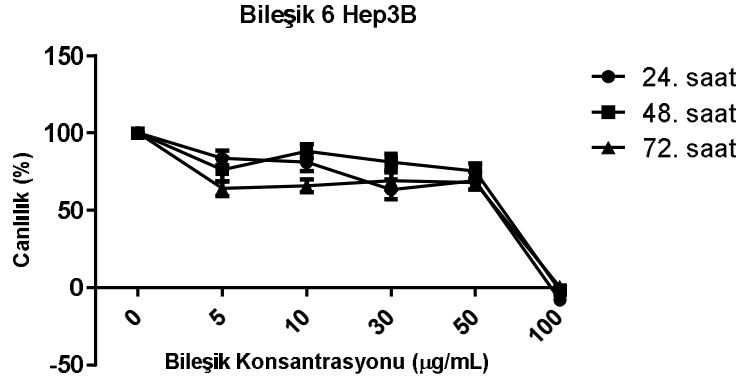


**Şekil 4.15.** Bileşik 5'in A549, BEAS-2B, Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

Şekil 4.16'da Bileşik 6'nın A549, BEAS-2B, Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi gösterilmiştir. Bileşik 6, Hep3B ve HCT116 hücre hatları üzerine düşük sitotoksik etki gösterirken A549 ve BEAS-2B hatları için saptanan IC<sub>50</sub> değerleri oldukça dikkat çekicidir. Bu maddenin 72. saat IC<sub>50</sub> değerleri A549 ve

BEAS-2B hücre hatları için sırasıyla 6.27  $\mu\text{g/mL}$  ve 54.88  $\mu\text{g/mL}$  olarak saptanmıştır (Çizelge 4.1-4.2).

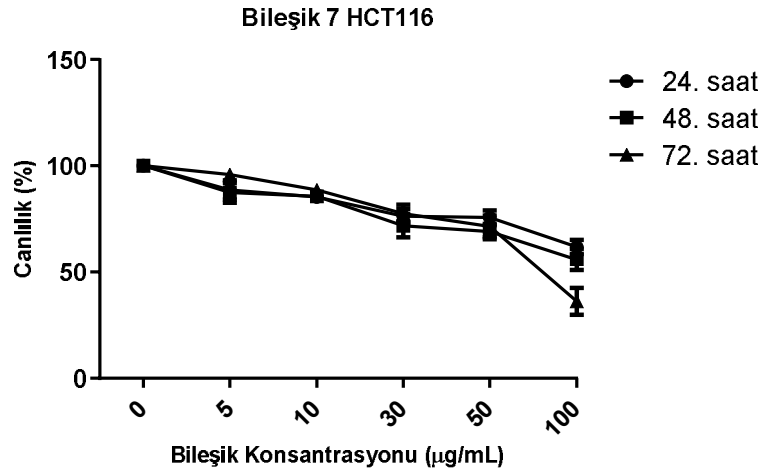
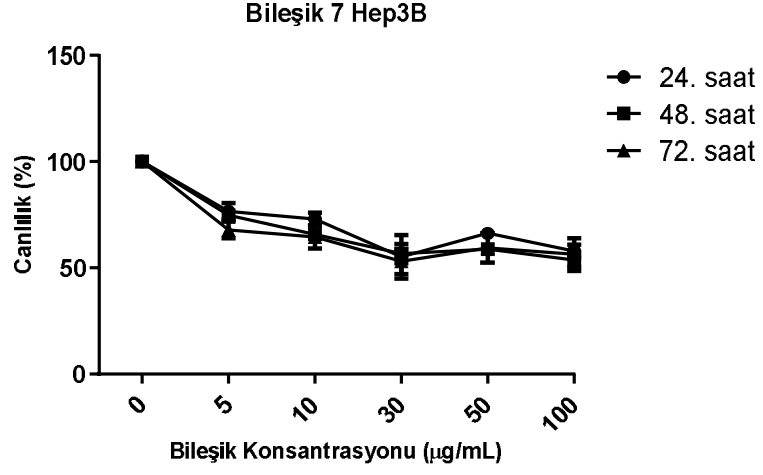




**Şekil 4.16.** Bileşik 6'nın A549, BEAS-2B, Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

Bileşik 7'nin Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi Şekil 4.17'de verilmiştir. Bileşik 7'nin Hep3B hücre hattı için 24., 48. ve 72. Saat IC<sub>50</sub> değerleri saptanamamıştır. HCT116 hücre hattı üzerinde ise sadece 72. saatte IC<sub>50</sub> değeri saptanabilmiştir ve bu değer 80.6 µg/mL'dir (Çizelge 4.1).

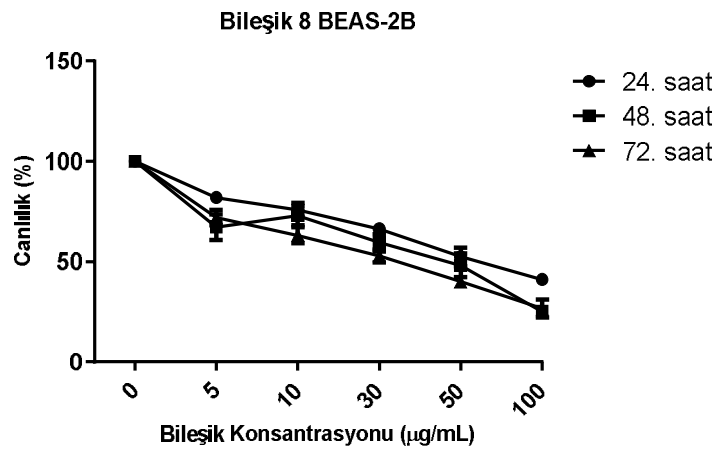
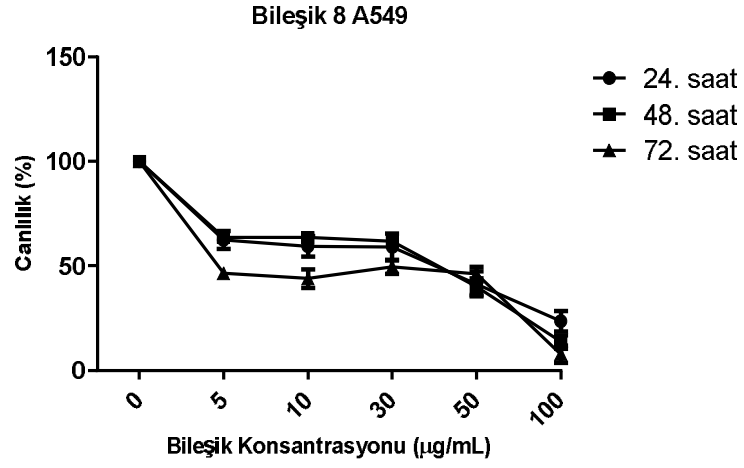


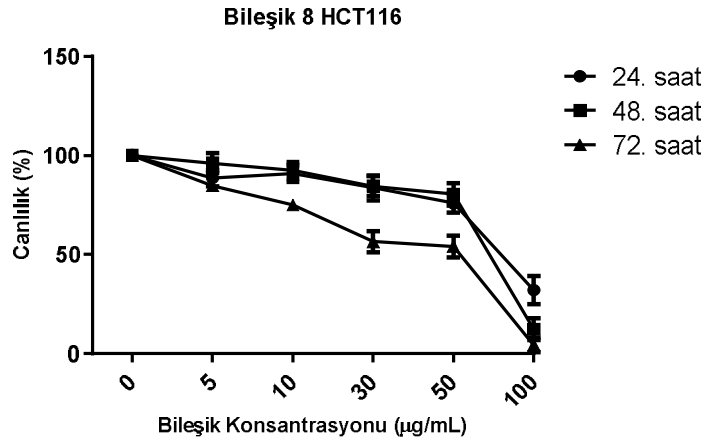
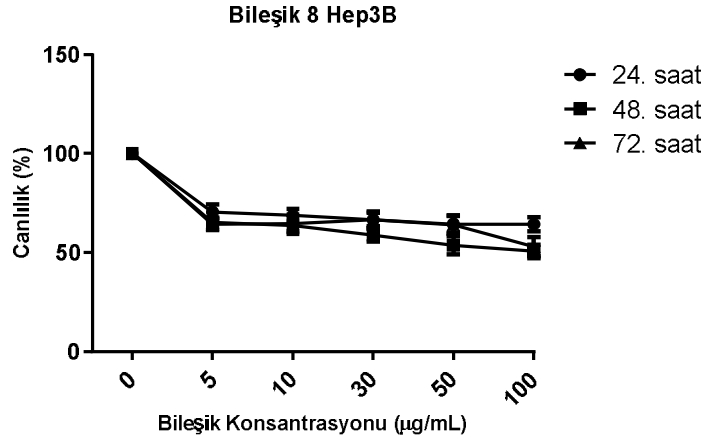


**Şekil 4.17.** Bileşik 7'nin Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

Şekil 4.18'de Bileşik 8'in dört hücre hattı üzerinde zamana bağlı sitotoksik etkisi gösterilmiştir. Bileşik 8'in Hep3B hücreleri üzerine  $IC_{50}$  değeri belirlenemezken HCT116 hücreleri üzerinde de düşük sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bileşik 8'in A549 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi 24., 48. ve 72. saatler için sırasıyla 40.28, 40.86 ve 4.66

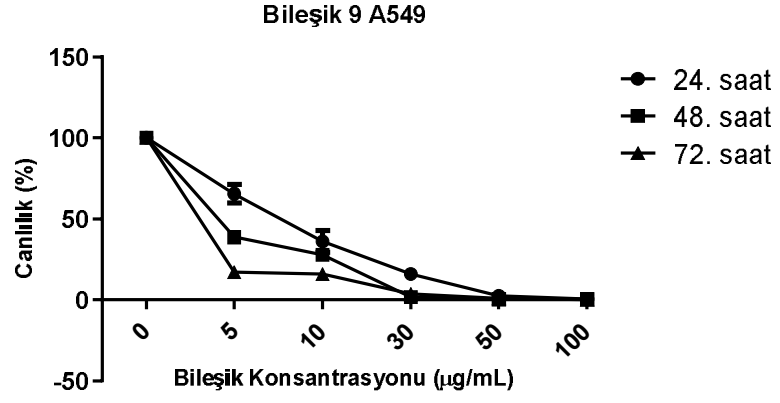
$\mu\text{g/mL}$  olarak saptanırken, BEAS-2B hücre hattı üzerine  $\text{IC}_{50}$  değerleri 60.13, 46.54 ve 34.34  $\mu\text{g/mL}$  olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1-4.2).



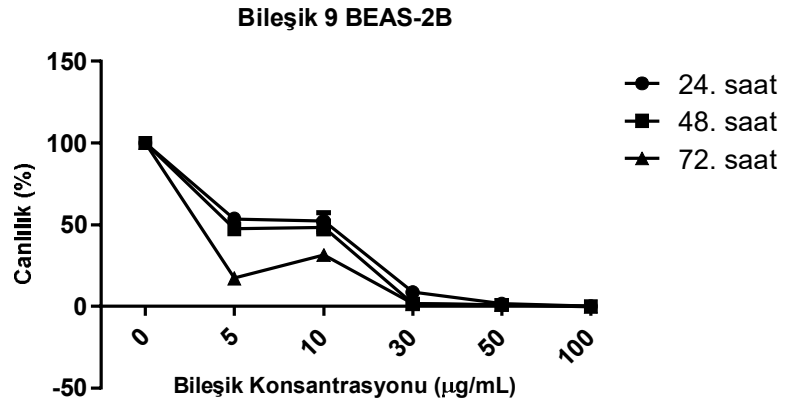


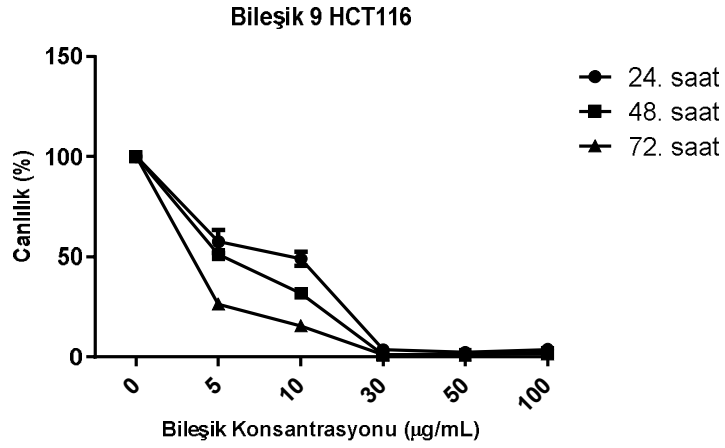
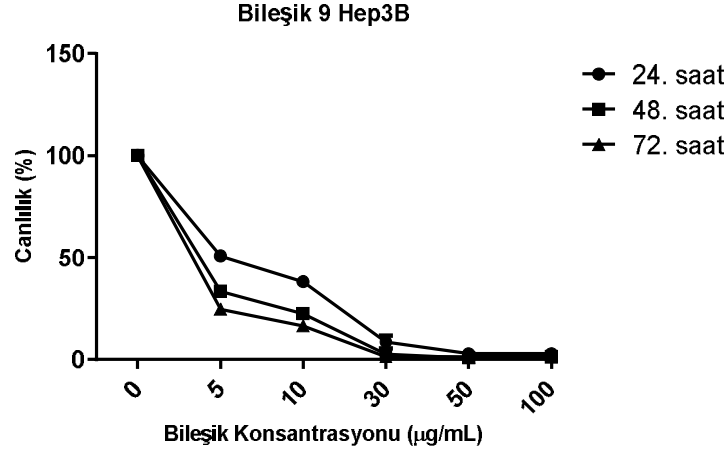
**Şekil 4.18.** Bileşik 8'in A549, BEAS-2B, Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

Şekil 4.19'da görüldüğü gibi Bileşik 9 dört hücre hattı üzerinde de yüksek sitotoksik etki göstermiştir. Bileşik 9'un A549, BEAS-2B, Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine 72. saatlik IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 3.01, 3.02, 3.32 ve 1.95 µg/mL olarak saptanmıştır (Çizelge 4.1-4.2).



a)





**Şekil 4.19.** Bileşik 9'un A549, BEAS-2B, Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerine zamana bağlı sitotoksik etkisi

Çizelge 4.1'de Hep3B ve HCT116 hücre hatlarına uygulanan dokuz benzimidazol türevi bileşiğin (Bileşik 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ve 9) ve sisplatinin 24., 48. ve 72. saat  $IC_{50}$  değerleri verilmiştir. Bu bileşikler içerisinde özellikle Bileşik 9'un 72. saat sonundaki  $IC_{50}$  değerleri (Hep3B için  $3.32 \mu\text{g/mL}$ , HCT116 için  $3.4 \mu\text{g/mL}$ ) sisplatin kadar iyi bir sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Yine Bileşik 4'ün de Hep3B üzerine  $7.2 \mu\text{g/mL}$  olan 72. saat  $IC_{50}$  değeri ve HCT116 üzerine  $8.05 \mu\text{g/mL}$  olan  $IC_{50}$  değeri bu

bileşimin de potansiyel bir ilaç olarak göz önüne alınması gerektiğini göstermektedir. Bu nedenle, kaspaz-3 ve western blotlama uygulamalarında bu iki bileşik ve bu iki hücre hattı ile çalışılmıştır.

**Çizelge 4.1.** Bileşiklerin Hep3B ve HCT116 hücre hatları üzerine 24., 48. ve 72. saat IC<sub>50</sub> değerleri (µg/mL).

| MTT<br>µg/mL<br>(IC <sub>50</sub> değerleri) | Hep3B    |          |          | HCT 116  |          |          |
|--|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|  | 24. saat | 48. saat | 72. saat | 24. saat | 48. saat | 72. saat |
| Bileşik 1                                    | 62.46    | 70.95    | 51.37    | 43.22    | 20.53    | 20.39    |
| Bileşik 2                                    | X        | X        | X        | 97.85    | 65.01    | 77.11    |
| Bileşik 3                                    | 70.71    | 92.62    | 93.81    | X        | 70.78    | 21.68    |
| Bileşik 4                                    | 13.90    | 14.31    | 7.20     | 13.47    | 7.43     | 8.05     |
| Bileşik 5                                    | 49.96    | 38.80    | 36.46    | 61.86    | 25.78    | 19.54    |
| Bileşik 6                                    | 62.40    | 66.52    | 63.34    | 58.11    | 29.99    | 52.94    |
| Bileşik 7                                    | X        | X        | X        | X        | X        | 80.6     |
| Bileşik 8                                    | X        | X        | X        | 79.49    | 72.38    | 54.16    |
| Bileşik 9                                    | 5.33     | 3.75     | 3.32     | 9.45     | 5.30     | 3.40     |
| Sisplatin                                    | 7.87     | 3.68     | 3.62     | 5.63     | 2.16     | 1.95     |

Çizelge 4.2’de A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına uygulanan 6 bileşimin (Bileşik 1, 4, 5, 6, 8 ve 9) 24., 48. ve 72. saat IC<sub>50</sub> değerleri verilmiştir. (\*) işareti ile belirtilmiş olan bileşiklerin (Bileşik 2, 3 ve 7) IC<sub>50</sub> değerleri, Apohan ve arkadaşları tarafından 2017 yılında yaptıkları çalışmada A549 ve BEAS-2B hücre hatları için elde edilen değerlerdir [109]. Diğer altı benzimidazol bileşik içerisinde özellikle Bileşik 6 ve 8’in kayda değer bir etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir. Sisplatinle A549 hücreleri üzerine 4.31 µg/mL ve

BEAS-2B hücreleri üzerine de 1.78 µg/mL IC<sub>50</sub> değerleri saptanmıştır. Bileşik 6 ve 8'in A549 ve BEAS-2B hücreleri üzerine 6.27 µg/mL ile 54.88 µg/mL ve 4.66 µg/mL ile 34.34 µg/mL olan IC<sub>50</sub> değerleri, bu bileşiklerin etkili potansiyel ilaçlar olabileceğini göstermiştir. Bu nedenle, kaspaz-3 ve western blotlama uygulamalarında bu iki bileşik ve bu iki hücre hattı ile çalışılmıştır.

**Çizelge 4.2.** Bileşiklerin A549 ve BEAS-2B hücre hatları üzerine 24.,48. ve 72. saat IC<sub>50</sub> değerleri (µg/mL).

| MTT<br>µg/mL<br>(IC <sub>50</sub> değerleri) | A549     |          |          | BEAS-2B  |          |          |
|--|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|  | 24. saat | 48. saat | 72. saat | 24. saat | 48. saat | 72. saat |
| Bileşik 1                                    | X        | 68.23    | 51.66    | 61.21    | 54.59    | 44.84    |
| Bileşik 2                                    | X*       | 27.84*   | 1.97*    | 65.67*   | 59.77*   | 59.8*    |
| Bileşik 3                                    | 50.98*   | 15.02*   | 1.9*     | 37.81*   | 33.35*   | 32.67*   |
| Bileşik 4                                    | 43.61    | 24.97    | 15.12    | 39.20    | 19.74    | 25.39    |
| Bileşik 5                                    | 67.72    | 24.04    | 19.47    | 30.32    | 22.43    | 22.88    |
| Bileşik 6                                    | 93       | 45.45    | 6.27     | 61.89    | 54.91    | 54.88    |
| Bileşik 7                                    | X*       | X*       | 1.87*    | 40.54*   | 28.57*   | 24.5*    |
| Bileşik 8                                    | 40.28    | 40.86    | 4.66     | 60.13    | 46.54    | 34.34    |
| Bileşik 9                                    | 7.65     | 4.08     | 3.01     | 11.03    | 4.75     | 3.02     |
| Sisplatin                                    | 16       | 5.10     | 4.31     | 4.40     | 2.22     | 1.78     |

\*Apohan ve arkadaşları (2017)

### 4.3. Bileşiklerin Minimum İnhibe Edici Konsantrasyon Değerleri

Bu çalışmada kullanılan benzimidazol türevi bileşiklerin antimikrobiyal aktivitelerinin tespit edilmesi amacıyla *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* bakteri türleri ve *C. albicans*, *C. tropicalis* maya türleri kullanılmıştır. Hazırlanan konsantrasyonlar

bileşikler için 12.800 µg/mL, gentamisin için 200 µg/mL ve flukozanol için de 200 µg/mL'dir.

Çizelge 4.3'de de görülebileceği gibi bazı bileşikler sınırlı antimikrobiyal etki gösterirken bazıları da yüksek antimikrobiyal etki göstermiştir. Kullanılan tüm bileşikler *E. coli* üzerine düşük antimikrobiyal etki göstermiştir. Bileşik 1 ve 5 genel olarak mikroorganizmalar üzerine diğer bileşiklere kıyasla düşük antimikrobiyal aktivite göstermişlerdir. Bileşikler arasında Bileşik 4, 6, 8 ve 9 özellikle mayalar üzerine yüksek antifungal etki yapmıştır. *P. aeruginosa* ve *S. aureus* üzerine en yüksek antibakteriyel aktiviteyi 12.5 µg/mL ve 50 µg/mL MİK değeriyle Bileşik 4 göstermiştir.

Yapılan sitotoksosite çalışmalarında da bu dört bileşiğin etkisi, tripan mavisi ve MTT uygulamalarından açıkça görülmektedir.

**Çizelge 4.3.** Bileşiklerin MİK değerleri (µg/mL).

| Bileşikler ve Antibiyotikler | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>S. aureus</i> | <i>C. albicans</i> | <i>C. tropicalis</i> |
|------------------------------|----------------|----------------------|------------------|--------------------|----------------------|
| Bileşik 1                    | >100           | 50                   | >100             | >100               | >100                 |
| Bileşik 4                    | >100           | 12.5                 | 50               | 25                 | 25                   |
| Bileşik 5                    | >100           | >100                 | >100             | >100               | >100                 |
| Bileşik 6                    | >100           | 100                  | 100              | 25                 | 25                   |
| Bileşik 8                    | >100           | 100                  | >100             | 12.5               | 12.5                 |
| Bileşik 9                    | >100           | 50                   | 100              | 12.5               | 12.5                 |
| Gentamisin                   | 0.78           | 0.39                 | 3.125            |                    |                      |
| Flukonazol                   |                |                      |                  | 0.39               | 0.39                 |

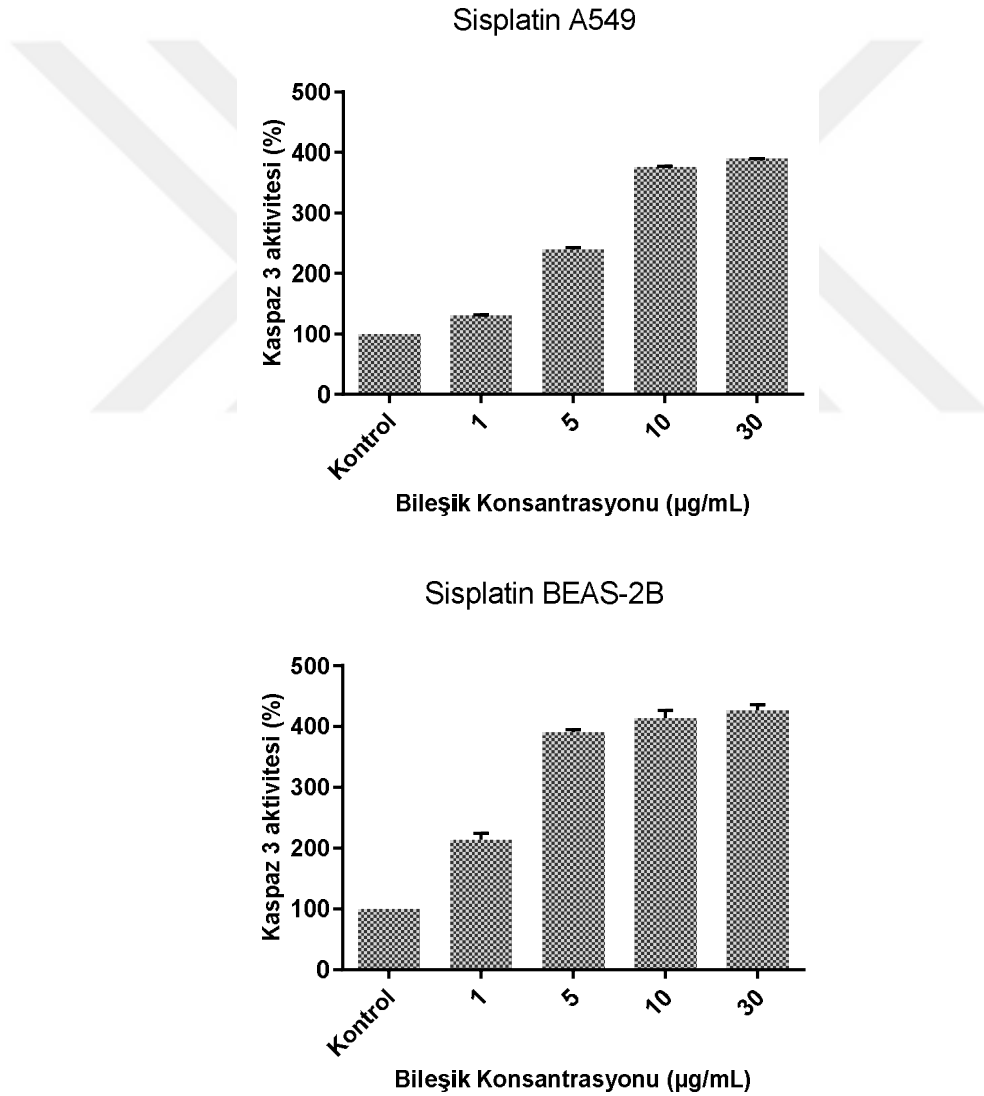
#### 4.4. Bileşiklerin Kaspaz-3 Aktivitesine Etkisi

Yapılan tripan mavisi ve MTT çalışmaları, kullanılan 9 benzimidazol bileşik içerisinde özellikle Bileşik 4, 6, 8 ve 9'un diğer beş bileşiğe kıyasla daha yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, kaspaz-3 aktivite çalışmaları bu dört madde ile yürütülmüştür. Tripan mavisi ve IC<sub>50</sub> sonuçlarına bağlı olarak Bileşik 6 ve 8 A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında test edilmiştir. Hep3B ve HCT116 hücre hatlarında ise Bileşik 4 ve 9 çalışılmıştır. Karşılaştırma ve kontrol amaçlı olarak bu dört hücre hattında sisplatinin de kaspaz-3 aktivitesine etkisi araştırılmıştır. Belirlenmiş olan 72. saatlik IC<sub>50</sub>



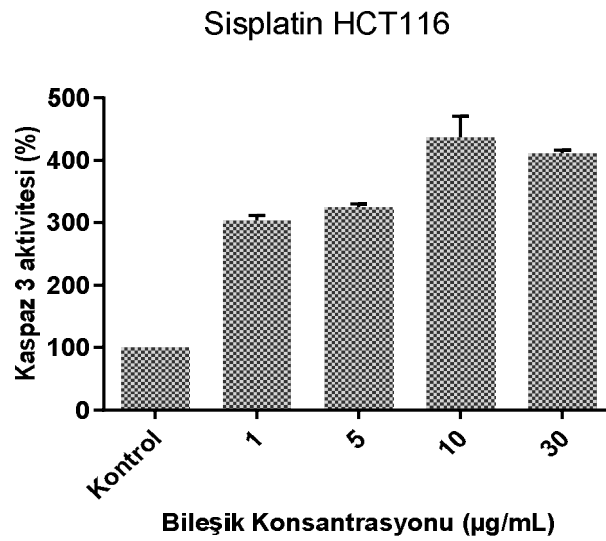
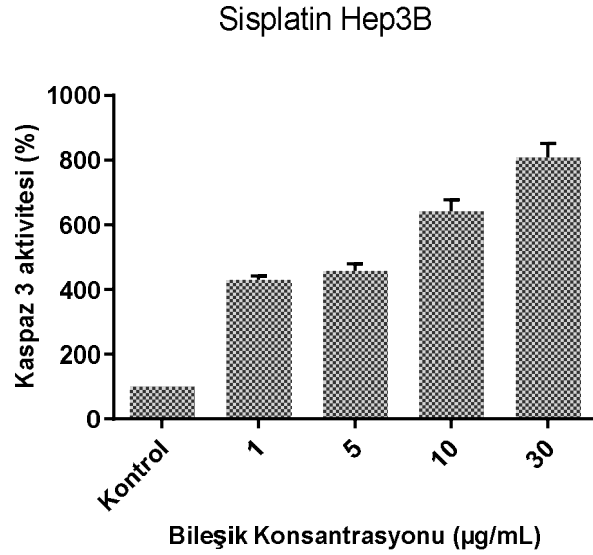
değerlerine bağlı olarak, kaspaz-3 aktivite tayini için 1, 5, 10 ve 30 µg/mL olmak üzere dört doz uygulaması yapılmıştır.

Şekil 4.20'den görülebileceği gibi A549 ve BEAS-2B hücrelerine sisplatin uygulaması kaspaz-3 aktivitesini belirgin oranda artırmıştır. Daha da önemlisi, sisplatin ilk doz uygulamasından itibaren (1 µg/mL) BEAS-2B hücre hattındaki kaspaz-3 aktivitesini A549 hücre hattına göre daha fazla artırmıştır. Bu, çalışılan benzimidazol bileşikleri ile karşılaştırmada önemli bir veridir.



Şekil 4.20. Sisplatin uygulanmış A549 ve BEAS-2B hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesinin kontrole göre değişimi (%)

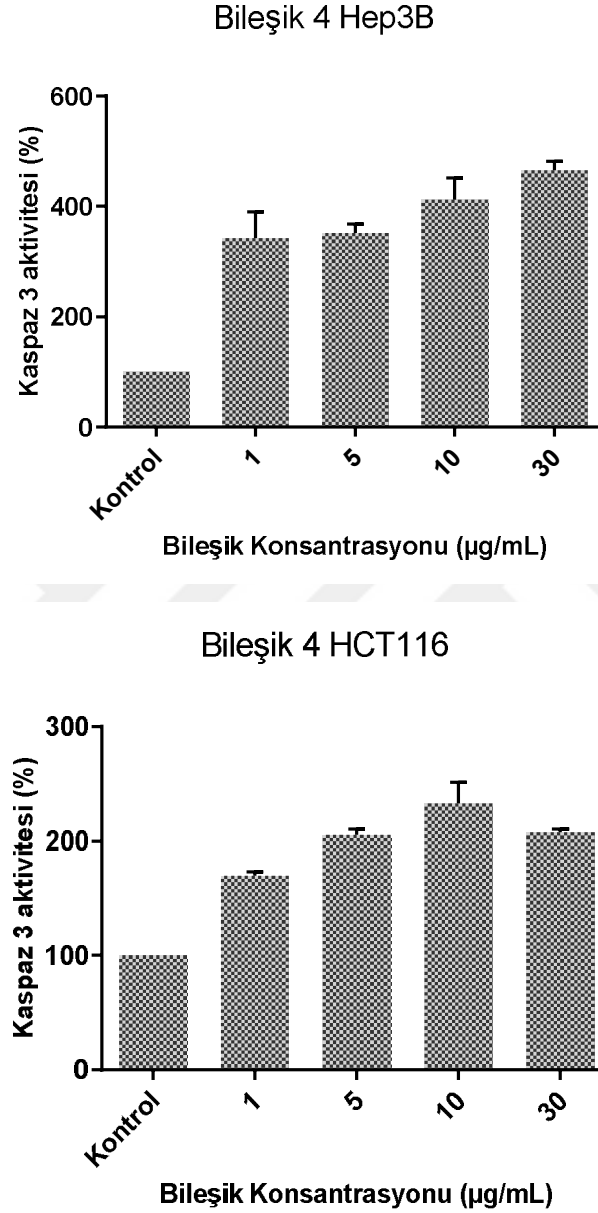
Şekil 4.21’de görüldüğü üzere sislartin Hep3B ve HCT116 hücre hatlarındaki kaspaz-3 aktivitesini ilk doz olan 1 µg/mL’den itibaren artırmıştır.



**Şekil 4.21.** Sislartin uygulanmış Hep3B ve HCT116 hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesinin kontrole göre değişimi (%)

Bileşik 4 uygulanmış Hep3B ve HCT116 hücre hatlarındaki kaspaz-3 aktivitelerine bakıldığında, bu bileşiğin her iki hücre hattında da ilk dozdan itibaren yüksek bir etki

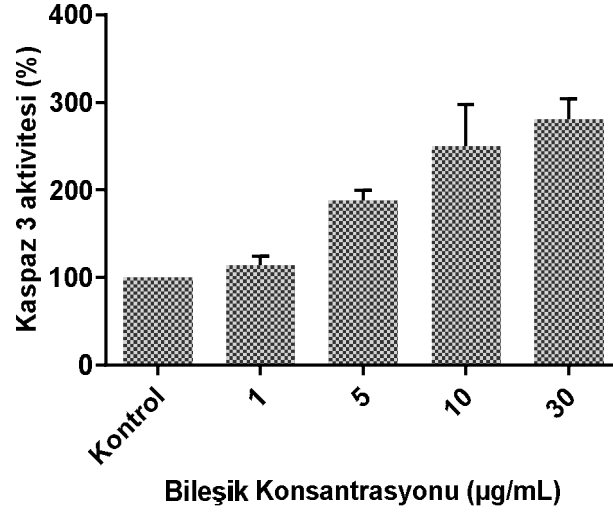
gösterdiği, özellikle Hep3B hücre hattında HCT116'ya göre bariz fark oluşturduğu görülmektedir (Şekil 4.22).



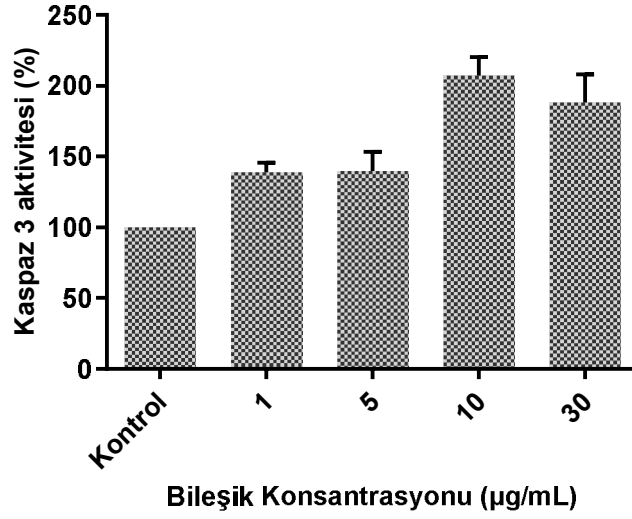
**Şekil 4.22.** Bileşik 4 uygulanmış Hep3B ve HCT116 hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesinin kontrole göre değişimi (%)

Bileşik 6 uygulanmasına bağlı olarak A549 ve BEAS-2B hücrelerinde kaspaz-3 aktivite değişimine bakıldığında, Bileşik 6'nın A549 hücrelerine kıyasla BEAS-2B hücre hattı üzerindeki etkisi daha azdır (Şekil 4.23).

Bileşik 6 A549

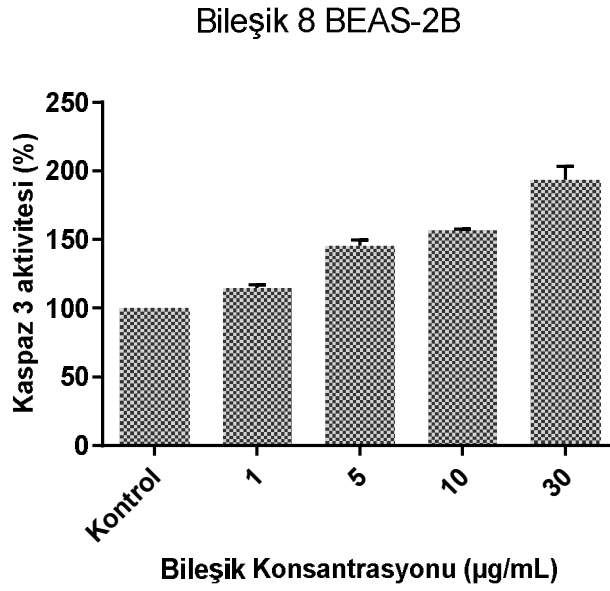
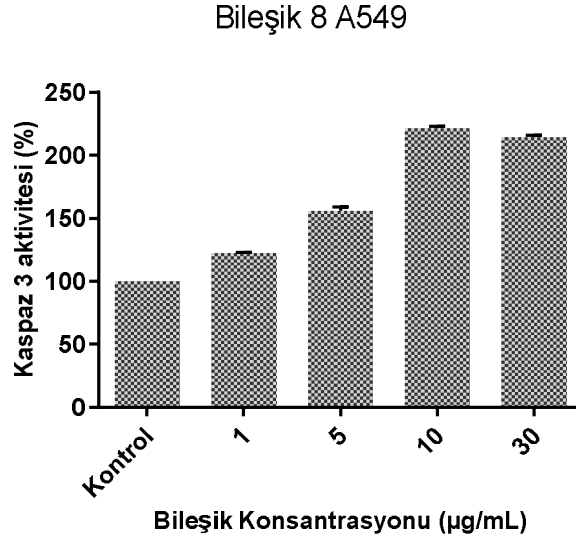


Bileşik 6 BEAS-2B



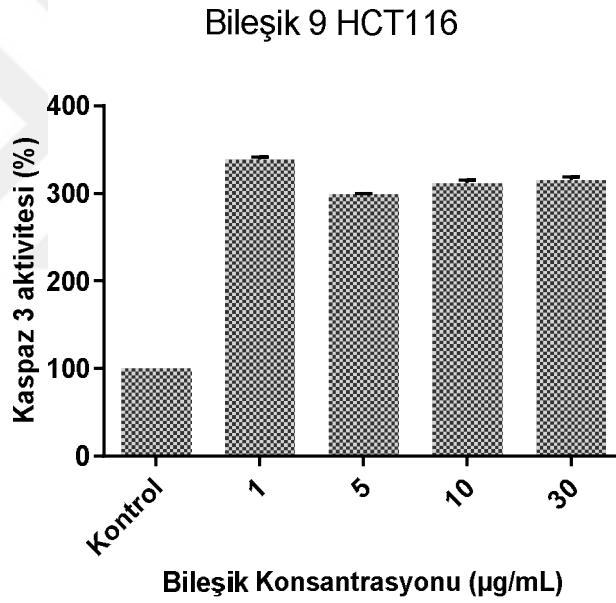
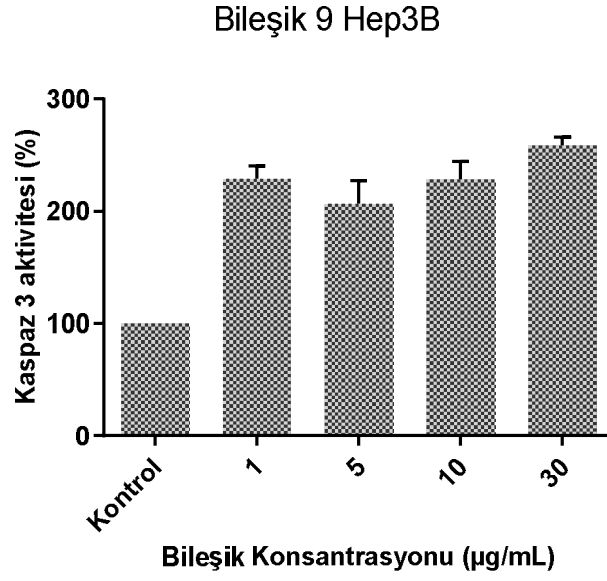
**Şekil 4.23.** Bileşik 6 uygulanmış A549 ve BEAS-2B hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesinin kontrole göre değişimi (%)

Bileşik 6'da olduğu gibi Bileşik 8'inde BEAS-2B hücrelerindeki kaspaz-3 aktivitesine etkisi azdır ve bu bileşikte de bu fark oldukça barizdir. Özellikle 10 µg/mL doz farkı daha önemli görülmektedir (Şekil 4.24).



**Şekil 4.24.** Bileşik 8 uygulanmış A549 ve BEAS-2B hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesinin kontrole göre değişimi (%)

Şekil 4.25'de görülen kaspaz-3 aktivite değişimi Bileşik 9'un da sisplatin kadar yüksek bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.



**Şekil 4.25.** Bileşik 9 uygulanmış Hep3B ve HCT116 hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesinin kontrole göre değişimi (%)

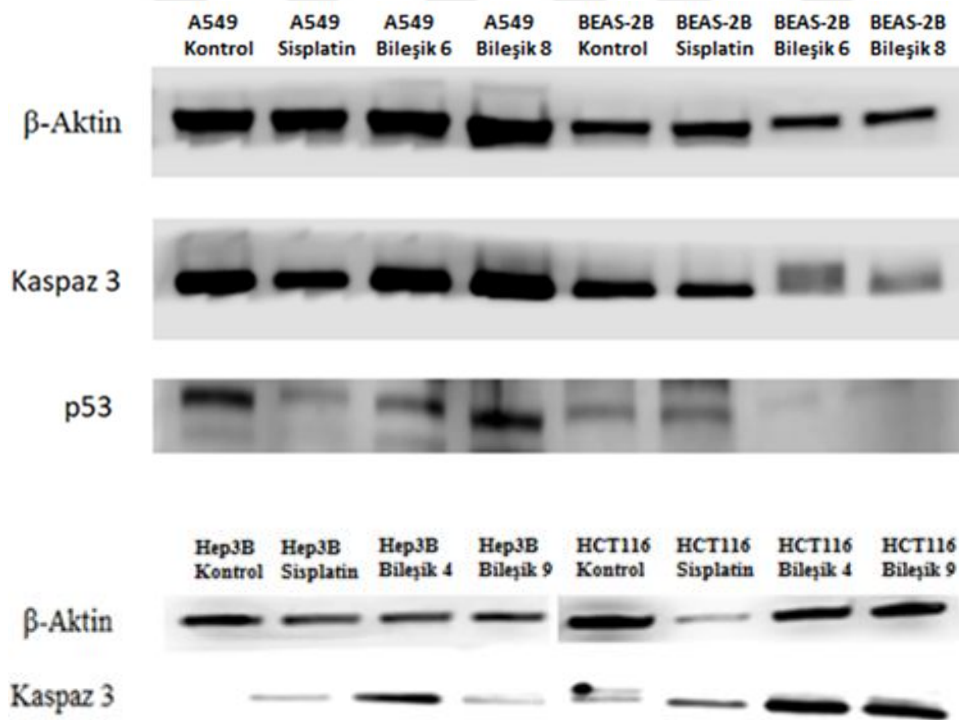
#### 4.5. Bileşiklerin Protein İfadeleri Üzerine Etkisi

Çalışmada kullanılan bir kısım bileşiğin apoptoz sinyal yolağında görev alan bazı proteinlerin ifadesini nasıl etkilediklerini belirlemek için Kısım 3.7’de açıklanan Western Blotlama çalışmaları yapılmıştır. MTT çalışmaları sonucu belirlenen 72. saat IC<sub>50</sub> değerlerine bağlı olarak, Bileşik 6 ve 8’in A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında, Bileşik 4 ve

9'un da Hep3B ve HCT116 hücre hatlarında apoptoz yolağındaki önemli proteinler olan kaspaz-3 ve p53 proteinlerinin ifadeleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Sisplatin de ayrıca çalışılmıştır. Referans bir protein olan  $\beta$ -aktinin de ifadesi izlenmiştir.

Şekil 4.26'da Bileşik 6 ve 8 uygulanmış A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında  $\beta$ -Aktin, kaspaz-3 ve p53 protein ifadeleri görülmektedir. MTT ve kaspaz-3 aktivite tayini sonuçlarına paralel olarak bu bileşiklerin sağlıklı BEAS-2B hücre hattı üzerinde etkilerinin sisplatinle karşılaştırıldığında sınırlı olmasına karşın, A549 hücre hattı üzerine daha etkili olduğu protein ifade düzeylerinden net bir şekilde görülmektedir.

Şekil 4.26'da ayrıca, Bileşik 4 ve 9 uygulanmış Hep3B ve HCT116 hücre hatlarında kaspaz-3 protein ifadeleri de görülmektedir. Bileşik 9 uygulanmış Hep3B hücre hattında, sisplatin uygulanmış olan Hep3B hücre hattındakine göre benzer kaspaz-3 ifadeleri gözlenmiştir. Bileşik 4 uygulanmış Hep3B hücre hattında sisplatin uygulanmış olan Hep3B hücre hattındakine göre kaspaz-3 ifadesi daha fazla indüklenmiştir. Bileşik 4 ve 9 uygulanmış HCT116 hücre hatlarında sisplatine göre kaspaz-3 ifadesi daha fazla indüklenmiştir.



**Şekil 4.26.** Bileşik 4, 6, 8 ve 9 uygulanmış dört hücre hattında  $\beta$ -aktin, kaspaz-3 ve p53 protein ifadeleri. (Hep3B ve HCT116 hücre hatları üzerinde sisplatin, Bileşik 4 ve Bileşik 9'un p53 ifadeleri gözlenmemiştir)

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada yeni sentezlenmiş dokuz farklı benzimidazol bileşiğın A549, HCT116 ve Hep 3B kanser hücre hatları ile BEAS-2B sağlıklı hücre hattı üzerindeki sitotoksik ve antimikrobiyal etkileri araştırma bulgularında (Kısım 4.) yer verildiği gibi farklı yöntemlerle çalışılmıştır. Sonuçlardan da anlaşılacağı üzere benzimidazol türevi bileşiklerin kanser hastalığının tedavisi için geliştirilecek olan metal bazlı ilaçların üretilmesinde önemli bir potansiyele sahip olduğu görülmektedir.

Önceden de bahsedildiği gibi özellikle kansere karşı çalışılan ilaçlarda elde edilmek istenen amaç kanser hücrelerine sitotoksik etki yaratan ancak sağlıklı hücrelere karşı düşük sitotoksikite gösteren ilaçların keşfidir. Bu çalışmada kullanılan bileşiklerin kanser hücre hatları üzerindeki etkileri önemlidir. Özellikle BEAS-2B hücre hattı üzerindeki etkileri önemli ve çalışma için değerli bir veridir. Aynı zamanda bu benzimidazol bileşiklerinin bu hücre hatları üzerindeki etkileri mevcut kullanılan kemoterapi ilacı olan sisplatinle karşılaştırılmıştır. Bu bağlamda, çalışmada kullanılan benzimidazol bileşiklerinin bazıları bu açıdan değerlendirildiğinde etkili sonuçlar göstermiştir.

Diğer bir husus; özellikle sitotoksik etki tespiti için çalışmada kullanılan yöntemler sonucunda alınan verilerin bir tutarlılık içinde olması çalışmanın yüksek bir güvenilirliğe sahip olduğunu göstermektedir.

Çalışmada kullanılan benzimidazol bileşiklerinin sitotoksik etkilerinin incelendiği ilk yöntem olan tripan mavisi çalışmalarında hücre hatlarına 20, 30, 40, 50 ve 100 µg/mL olmak üzere beş doz aralığında bileşikler uygulandı ve kontrol ile karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlar ilk doz olan 20 µg/mL'den itibaren bütün bileşiklerin bütün hücre hatları üzerinde sitotoksik etki gösterdiğini belirlendi. Ancak bu bileşiklerin bazılarının diğerlerine göre daha etkili olduğu belirlendi. Bunlar içerisinde Bileşik 4'ün dört hücre hattı üzerinde oldukça etkili olduğu görüldü. Öte yandan Bileşik 6'nın özellikle A549 hücreleri üzerinde BEAS-2B hücre hattı üzerinde gösterdiği etkiden daha yüksek bir etki gösterdiği belirlendi. Bu sonuç önceden de bahsedildiği gibi sağlıklı hücreler üzerinde sitotoksik etkisi düşük ancak kanser hücreleri üzerinde yüksek toksisiteye sahip ilaç geliştirme amacı doğrultusunda önemli bir sonuçtur. Yine tripan mavisi deneyi sonucunda Bileşik 9'unda her dört hücre hattı üzerinde etkili sitotoksik etki gösterdiği görüldü. Ancak Bileşik 4 ve Bileşik 9'un sağlıklı hücre hattı üzerinde de yüksek sitotoksik etki gösterdiğini belirtmek gerekir.

Tripan mavisi deneyi sonuçları bütün bileşiklerin sitotoksik etkilerinin olduğunu gösterdi. Daha hassas bir sitotoksik ölçüm yöntemi olan MTT yöntemi ile bütün



bileşiklerin hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerinin IC<sub>50</sub> değerleri hesaplanarak daha hassas bir ölçümle araştırılmasına karar verildi. MTT deneyleri sonunda tripan mavisi deneyi sonucu elde edilen bilgilerin büyük oranda doğruluğu teyit edildi ve çalışmanın sonraki aşamaları için hangi bileşiklerin, hangi dozlarda ele alınacağına karar verildi.

MTT deneyleri sonucu çalışılan dokuz bileşik içinde dört bileşiğin oldukça etkili olduğu belirlendi. Bu bileşiklerin 72. saat IC<sub>50</sub> değerleri baz alınarak elde edilen sonuçlara göre Bileşik 4'ün Hep3B ve HCT116 hücre hatları üzerindeki sırasıyla IC<sub>50</sub> değerleri 7.2 ve 8.04 µg/mL'dir (Çizelge 4.1). Yine bu iki hücre hattı için Bileşik 9'un Hep3B ve HCT116 hücre hatları üzerindeki IC<sub>50</sub> etki değerleri sırasıyla 3.32 ve 3.4 µg/mL'dir (Çizelge 4.1). Hep3B ve HCT116 hücre hatları üzerindeki sisplatinin 72. saat IC<sub>50</sub> etki değerlerinin sırasıyla 3.62 ve 1.95 µg/mL çıkması bu bileşiklerin etkin bileşikler olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.1). Şimdiye kadar hem karaciğer karsinoması hem de kolon karsinomasında benzimidazol türevi bileşiklerin kullanımı ile elde edilen sonuçlarda bu bileşik grubunun sisplatin gibi standart kullanılan kolşisin ve 5-Fluorourasil (5-FU) gibi ilaçlarla da karşılaştırıldığında bu kanser türleri üzerinde etkili kemoterapötik ajanlar olabileceğini göstermiştir. Paul ve arkadaşları tarafından yapılan kumarin-benzimidazol türevi 3-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-7-(substituted amino)-2H-chromen-2-one bileşiklerin HCT116 hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkilerini inceledikleri çalışmalarında bu bileşiğin HCT116 hücre hattı üzerinde % 62,25 büyüme inhibisyonu gösterdiğini buna karşın referans bileşik olarak kullandıkları 5-FU'nun % 17,8 büyüme inhibisyonuna sahip olduğunu göstermişlerdir [140]. Bir diğer çalışmada da Yadav ve arkadaşları sentezledikleri 2-(1H-benzo[d]imidazol-2-ylthio)-N-(substituted 4-oxothiazolidin-3-yl) acetamides türevi benzimidazol bileşiklerin HCT116 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisini inceledikleri çalışmalarında iki bileşiğin HCT116 hücre hattı üzerindeki sitotoksik IC<sub>50</sub> değerlerini sırasıyla 0.00005 ve 0.00012 µM/mL olarak belirlerken referans bileşik olarak kullandıkları 5-Fluorourasil'in HCT116 hücre hattı üzerindeki sitotoksik IC<sub>50</sub> değerini 0.00615 µM/mL olarak tespit etmişlerdir [141].

Bileşikler içerisinde Bileşik 6, 8 ve 9'un A549 ve BEAS-2B hücre hatları üzerinde de güçlü sitotoksik etkileri görüldü (Çizelge 4.2). Özellikle Bileşik 6 ve 8'in bu hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri benzimidazollerin neden etkili birer kemoterapötik ajanlar olmaya aday bileşikler olduğunu göstermesi açısından önemlidir. MTT deneyi sonucu elde edilen 72. saat IC<sub>50</sub> değerlerinde Bileşik 6'nın A549 hücre hattı üzerindeki IC<sub>50</sub> değeri 6.27 µg/mL iken BEAS-2B sağlıklı hücre hattı üzerindeki IC<sub>50</sub> değeri 54.88 µg/mL olarak tespit edildi. Bileşik 8'in A549 hücre hattı üzerindeki IC<sub>50</sub> değeri 4.66

$\mu\text{g/mL}$  iken bu bileşimin BEAS-2B hücre hattı üzerindeki  $\text{IC}_{50}$  değeri  $34.34 \mu\text{g/mL}$  olarak tespit edildi. Referans bileşik olarak kullanılan sisplatinin A549 hücre hattı üzerindeki  $4.31 \mu\text{g/mL}$ 'lik  $\text{IC}_{50}$  değerine karşılık BEAS-2B sağlıklı hücre hattı üzerindeki  $1.78 \mu\text{g/mL}$  olan sitotoksik etkisi düşünüldüğünde en başta ifade ettiğimiz gibi kanser hücre hatları üzerinde etkili ancak sağlıklı hücrelere daha az sitotoksik etkiye sahip ilaç geliştirme hedefi doğrultusunda Bileşik 6 ve 8'in buna uygun iyi seçenekler olabileceğini gösterdi. Bileşik 9'un A549 hücre hattı üzerindeki  $3.01 \mu\text{g/mL}$  olan  $\text{IC}_{50}$  değeri bu bileşimin de iyi bir sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir ancak Bileşik 9'un sağlıklı hücre hattı BEAS-2B üzerinde de  $1.78 \mu\text{g/mL}$ 'lik yüksek bir toksisite göstermesi önemlidir. Benzimidazol bileşiklerin bu anlamda etkili ilaçlar olabileceğinin gösterildiği diğer çalışmalarda da görülmektedir. Bu çalışmalardan bir tanesi, bu çalışmada da Hep3B ve HCT116 hücreleri üzerinde sitotoksik etkilerinin bakıldığı Bileşik 2, 3 ve 7'nin A549 ve BEAS-2B hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerinin bakıldığı ve Apohan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmadır. Bu çalışmada Bileşik 2, 3 ve 7'nin A549 hücre hattı üzerinde MTT deneyi sonucunda 72. saat sonundaki  $\text{IC}_{50}$  değerleri sırasıyla  $1.97$ ,  $1.9$  ve  $1.87 \mu\text{g/mL}$  olarak tespit edilirken BEAS-2B hücre hattı üzerindeki  $\text{IC}_{50}$  değerleri  $59.8$ ,  $32.67$  ve  $24.5 \mu\text{g/mL}$  olarak tespit edilmiştir [109]. Bu çalışmada bu bileşiklerin HCT116 ve Hep3B hücre hatları üzerinde etkili sitotoksik aktivite göstermemelerine rağmen A549 ve BEAS-2B hücre hatları üzerinde Bileşik 6 ve 8 gibi bir etki göstermeleri de yine benzimidazol bileşiklerinin bu anlamda etkisini göstermektedir. Benzimidazol türevi bileşiklerin birçok farklı araştırmacılar tarafından birçok kanser hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkilerini inceledikleri MTT deney sonuçları da benzimidazollerin etkin kemoterapötik ajanlar olabileceğini ortaya koymaktadır [142-145].

Farklı hücre hatları üzerinde yapılan çalışmalarda farklı benzimidazol türevi bileşiklerin MTT yöntemi ile sitotoksik aktivite sonuçları benzimidazollerin güçlü etkiye sahip olduklarını göstermiştir. Atmaca ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada 5 farklı benzimidazol türevi bileşimin MCF-7 (meme kanseri), DU-145 (prostat kanseri), H69AR (akciğer kanseri) ve sağlıklı HEK-293 (insan embriyonik böbrek hücreleri) hücre hatları üzerinde yaptıkları sitotoksik çalışmada referans bileşik olarak 5-flororasil kullanılmıştır. Bu beş bileşik içerisinde bir tanesi (2-[5,6-dichloro-2-ethyl-1H-benzimidazol-1-yl]-N'-[Bromophenylene]acetohydrazide) oldukça etkili sonuç göstermiştir. Bu bileşimin MCF-7, DU-145, H69AR ve sağlıklı HEK-293 hücre hatları üzerindeki  $\text{IC}_{50}$  değerleri sırasıyla  $17.8 \pm 0.24$ ,  $10.2 \pm 1.4$ ,  $49.9 \pm 0.22$  ve  $>100 \pm 0.32 \mu\text{g/mL}$  olarak tespit edilmiştir. Referans bileşik 5-FU'nun bu hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi sırası ile  $1.9 \pm 0.12$ ,  $1.7 \pm$

0.20,  $1.1 \pm 0.40$  ve  $0.9 \pm 0.14$   $\mu\text{g/mL}$  olarak belirlenmiştir [146]. Bu bileşiğin sağlıklı HEK-293 hücre hattı üzerindeki çok düşük sitotoksik etkisine karşın kanser hücreleri üzerindeki yüksek sitotoksik etkileri kayda değerdir. Ancak bu maddenin referans bileşik kadar yüksek bir sitotoksik etki göstermemesi de bir diğer gerçektir. Bizim çalışmamızda Bileşik 4, 6, 8 ve 9'un kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin referans bileşik olarak kullanılan sisplatin kadar veya biraz daha düşük sitotoksik aktivite gösterdikleri Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2'de görülmektedir.

Benzimidazol türevi bileşiklerin sitotoksik etkisinin çalışıldığı bir diğer çalışmada ise özellikle kobalt ve çinko metal bazlı benzimidazol türevlerinin bazı kanser hatları üzerindeki yüksek sitotoksik etkileri çinko ve kobalt bazlı benzimidazol bileşiklerin kansere karşı etkili ilaçlar olabilme potansiyellerini göstermesi açısından önemlidir. Çalışmada kobalt, çinko, mangan ve platin bazlı dört farklı benzimidazol bileşiğin MRC5-SV2 (akciğer kanser hücre hattı) ve MRC5 (sağlıklı akciğer fibroblast hücre hattı) hücre hatlarına uygulanması sonucu test edilen sitotoksik etkinliklerinde çinko ve kobalt bazlı benzimidazol bileşiklerin kanser hücre hattı olan MRC5-SV2 üzerinde platin ve mangan bazlı bileşiklere göre daha yüksek bir sitotoksikite gösterdiği ve özellikle çinko bazlı benzimidazol bileşiğin sağlıklı hücre hattı olan MRC5 üzerinde düşük bir sitotoksik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir [147]. Bu sonuç bu çalışmada da kullanılan çinko ve kobalt bazlı benzimidazoller olan Bileşik 4, 6, 8 ve 9'un özellikle A549 ve BEAS-2B üzerindeki etkileri düşünüldüğünde önemlidir. Bu çalışma sonuçları Apohan ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmanın sonuçlarını desteklemektedir (Çizelge 4.2). Öyle ki özellikle çinko bazlı bileşiklerin farklı kanser hücre hatları üzerinde yüksek bir sitotoksikiteye ve sağlıklı hücre hatları üzerinde ise düşük sitotoksikiteye sahip ilaçlar geliştirmek için uygun potansiyel adaylar olarak bakılabilir.

Yapılan bir diğer çalışmada Çevik ve arkadaşları sentezledikleri hidrazon kökenli benzimidazol türevi bileşiklerin A549 kanser hücre hattı ve sağlıklı hücre hattı NIH3T3 (fare embriyonik fibroblast hücreleri) hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkilerini referans bileşik olarak kullandıkları sisplatinin sitotoksik etkisiyle karşılaştırmışlardır. Bu bileşiklerden üçünün A549 kanser hücre hattı üzerinde sisplatinin 0,045 mM  $IC_{50}$  değerine karşılık 0.0316-0.06 mM  $IC_{50}$  değerleri arasında sitotoksik etkiye sahip olduklarını tespit etmişlerdir. Ancak bu üç bileşiğin sağlıklı hücre hattı NIH3T3 üzerindeki sitotoksik etkisinde sisplatinin tespit edilemeyen değerine karşılık bileşiklerin 0.06 ve 0.1 mM arasındaki  $IC_{50}$  değerleri dikkate alındığında sağlıklı hücre hattına karşı sisplatinden daha güçlü sitotoksik aktivitesi olduğunu gösterdiklerini belirtmek gerekir [148]. Wang ve

arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları çalışmada bir dizi 1-benzen asil-2-(1-metilindol-3-il)-benzimidazol türevleri tasarlanmış, sentezlenmiş ve potansiyel tübülün polimerizasyon inhibitörleri olarak ve antropik kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik aktivite için değerlendirilmiştir. Bu yeni bileşikler arasında bir bileşiğin A549, HepG2 ve MCF-7'ye karşı pozitif kontrol olarak kullanılan referans bileşikler kolşisin ve CA-4 ile karşılaştırıldığında en güçlü tübülün polimerizasyon inhibitör aktivitesi ( $IC_{50} = 1.5 \mu M$ ) ve antiproliferatif aktivite sergilediği (sırasıyla  $GI_{50} = 2.4, 3.8$  ve  $5.1 \mu M$ ) gösterilmiştir. Ayrıca bu bileşiğin G2 / M fazı hücre döngüsü tutuklaması ile bağlantılı A549 apoptozunu etkili bir şekilde indükleyebildiği de tespit edilmiştir [149].

Çalışmadaki bileşiklerin kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi kadar bu yeni benzimidazol türevi bileşiklerin bazı bakteri ve maya gibi mikrobiyal faktörler üzerindeki etkileri de oldukça önemlidir. Bu amaçla genel olarak yeni sentezlenen metal içerikli bileşiklerin sitotoksik etkisine bakıldığı gibi antimikrobiyal etkilerine de bakılmıştır. Bu amaçla çalışmada kullanılan yeni sentezlenmiş benzimidazol bileşiklerin bazı bakteri ve maya suşları üzerindeki etkileri minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) yöntemi ile belirlendi (Çizelge 4.3). Bileşiklerin antimikrobiyal etkileri değerlendirilirken bakteriler için gentamisin, mayalar için de flukonazol pozitif kontrol olarak kullanıldı. Çalışmada, bileşiklerin antimikrobiyal etkilerini belirlemek için gram negatif *E. coli* (ATCC 25922) ve *P. aeruginosa* (ATCC 27853), gram pozitif *S. aureus* (ATCC 29213) bakterileri ile *C. albicans* ve *C. tropicalis* maya suşları kullanıldı. Çalışılan bileşiklerden üç tanesi Bileşik 2, 3 ve 7 daha önce Apohan ve arkadaşları tarafından aynı bakteri ve maya suşları üzerinde çalışıldığı için bu çalışmada sadece Bileşik 1, 4, 5, 6, 8 ve 9'un bu bakteri ve maya suşları üzerindeki antimikrobiyal etkilerine bakıldı [109]. MİK deneyi sonunda alınan veriler değerlendirildiğinde bu altı bileşiğin *E. coli* ve *S. aureus* bakteri suşları üzerinde yüksek antimikrobiyal etki göstermedikleri tespit edildi. Buna karşın Bileşik 4'ün özellikle *P. aeruginosa* üzerindeki  $12.5 \mu g/mL$  minimum konsantrasyon değeri kayda değerdir. Yine özellikle Bileşik 8 ve 9'un *C. albicans* ve *C. tropicalis* maya suşları üzerindeki  $12.5 \mu g/mL$  olan MİK değerleri düşük konsantrasyonlar olarak dikkat çekmektedir. Yine de bütün bileşiklerin bu bakteri ve maya suşları üzerindeki minimum konsantrasyon değerleri referans bileşikler olan gentamisin ve flukonazolun minimum inhibisyon konsantrasyonlarından yüksek olduğu görüldü. Benzimidazol türevi bileşiklerin antimikrobiyal etkileri konusunda yapılan farklı çalışmalarda da bu bileşik grupların referans grubu bileşiklere göre (siproflakazin, amfisilin, flukonazol, amoksilin,

klorofenikol gibi) daha yüksek ya da daha düşük MİK değerlerine sahip oldukları gözlenmiştir [150, 151].

Küçükbaş ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada kobalt, çinko ve nikel bazlı benzimidazol bileşiklerin *E. faecalis* (ATCC 29212), *S. aureus*, (ATCC 29213), *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) bakterileri ile *C. albicans* and *C. tropicalis* maya suşları üzerindeki antimikrobiyal etkilerine MİK yöntemi ile bakılmıştır. Bileşiklerden bazılarının gram pozitif bakteriler (*E. faecalis* ve *S. aureus*) üzerinde 200 ve 800 µg/mL arasında bir MİK değerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Ancak bileşiklerden hiçbirinin gram negatif bakteriler (*E. coli* ve *P. aeruginosa*) üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermedikleri belirlenmiştir. Test edilen bazı bileşiklerin de maya suşları üzerinde 100 ile 800 µg/mL arasında MİK değerine sahip oldukları tespit edilmiştir [152]. Buna karşın bu çalışmada kullanılan kobalt ve çinko bazlı benzimidazol bileşiklerinden bileşik 4, 6, 8 ve 9'un Çizelge 4.3'de görüldüğü gibi başlıca gram negatif bakteri *P. aeruginosa* üzerindeki 12.5 µg/mL olan MİK değeri ve *C. albicans* ve *C. tropicalis* maya suşları üzerindeki 12.5 ile 25 µg/mL arasındaki inhibisyon değerleri daha iyi bir antimikrobiyal etkiye sahip olduklarını göstermektedir.

Bir diğer kayda değer çalışmada özellikle kobalt ve çinko bazlı benzimidazol bileşiklerin antimikrobiyal ajanlar olarak etkili potansiyele sahip olabilecekleri gösterilmiştir. Chkirate ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışmada sentezledikleri üç farklı kobalt ve çinko bazlı benzimidazol bileşiğinin *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirilmiş ve bu benzimidazol bileşiklerin bu bakteri suşları üzerinde etkili sonuçlara sahip oldukları gösterilmiş ve özellikle kobalt bazlı bir bileşiğin bakteri suşları üzerinde 6.25 µg/mL MİK değerine sahip olduğu tespit edilmiştir [153].

Çalışmadaki benzimidazol türevi bileşiklerin sitotoksik etkisi MTT deneyi sonucunda belirlendikten sonra etkili sonuçlar gösteren bu bileşiklerin sitotoksik etkiyi apoptotik ölüm yolağı ile gösterip göstermediklerini belirlemek amacıyla bu bileşikler hücreler ile muamele edildikten sonra kaspaz-3 aktiviteleri hesaplandı. MTT sonuçlarına göre çalışılmaya değer gördüğümüz Bileşik 4 ve 9'un HCT116 ve Hep3B hücre hatlarında, Bileşik 6 ve 8'in de A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında kaspaz-3 proteazı üzerindeki etkisine bakıldı. Yine bu bileşiklerin hücreler üzerindeki kaspaz-3 aktivitesi sisplatin uygulanmış hücrelerin kaspaz-3 aktiviteleri ile karşılaştırıldı. Kaspaz-3 aktivite tayini için hücrelere, bileşikler 1, 5, 10 ve 30 µg/mL olmak üzere dört doz olarak uygulandı. Şekil 4.33, 4.34 ve 4.37'ye bakıldığında Bileşik 4 ve 9'un HCT116 ve Hep3B hücre hatları

üzerinde ilk doz olan 1 µg/mL'den itibaren kaspaz-3'ü aktive ettikleri gözlemlendi. Bileşik 6 ve 8'in A549 ve BEAS-2B hücre hatları üzerindeki kaspaz-3 etkinlikleri Şekil 4.32, 4.35 ve 4.36'da görüldüğü gibidir. Burada özellikle 5 µg/mL olan doz değerinde daha belirgin görüldüğü gibi sisplatinin bu doz aralığında A549 kanser hücre hattına olan kaspaz-3 etkinliği fazla olmasına karşın aynı dozda BEAS-2B sağlıklı hücre hattındaki kaspaz-3 etkinliği daha yüksektir. Ancak Bileşik 6 ve 8'in bu dozda A549 kanser hücre hattındaki kaspaz-3 etkinlikleri fazla olmasına rağmen BEAS-2B sağlıklı hücre hattı üzerinde kaspaz-3 etkinlikleri hem sisplatine hem de bu bileşiklerin A549 hattı üzerindeki kaspaz-3 etkinliklerine göre daha düşüktür. Bu sonuçlar bu bileşiklerin etkili ve istenilen özelliklerde ilaç olma potansiyelini taşıdıklarını ve bu bileşikler üzerine ileri düzeyde araştırma yapılması gerektiğini göstermektedir. Benzimidazol bileşiklerinin hücrelerde kaspaz-3 aktivitesini sağlayarak apoptotik yolu başlatması birçok araştırmada ortaya konmuştur. Bu çalışmalar benzimidazollerin mitokondri membran geçirgenliğini değiştirmek, DNA stabilitesini bozmak, JNG sinyal yolağını aktive etmek, topoizomera 1 inaktivasyonu sağlamak gibi birçok yolla kaspaz-3 aktivitesini tetiklediklerini göstermiştir [154-156]. Bu çalışmada ve şimdiye kadar yapılan diğer çalışmalarda özellikle çinko ve kobalt bazlı benzimidazol türevlerinin birçoğunun kanser hücre hatlarında apoptotik yolağı net bir şekilde tetikledikleri görülebilmektedir. Bu çalışmadaki Bileşik 4, 6, 8 ve 9'un kaspaz-3 aktivite tayini sonuçları, bu maddelerin tam olarak apoptotik yolakta hangi faktörleri hedef aldığı konusunda bu sinyal yolağındaki bütün düzenleme mekanizmaları için çalışılabilecek bileşikler olduğunu göstermiştir. Örneğin Chen ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada sentezledikleri benzimidazol türevi bir bileşiğin HCT116 hücre hattında nasıl apoptotik yolu tetiklediği intrinsik ve ekstrinsik ölüm yolları detaylıca incelenerek ortaya çıkarılmıştır. Geliştirdikleri akridin bazlı olan N-[103]-2-butylacridin-9-amine benzimidazol bileşiğinin HCT116 hücre hattında hem ekstrinsik hem de intrinsik ölüm yollarını aktive ederek hücreleri apoptotik sürece soktuğunu göstermişlerdir. Bu bileşiğin HCT116 hücrelerinde hem Bcl-2'nin ifadesinde azalmaya sebep olarak hem de ROT (Reaktif Oksijen Türleri) üretimini arttırarak intrinsik ölüm yolu olan mitokondriden sitokrom-c salınımı tetikleyerek kaspaz-3 aktivitesini arttırdığı ve apoptotik yolu başlattığı gösterilmiştir. Bileşiğin aynı zamanda ölüm reseptörlerinden olan DR5'in ifadesini arttırarak kaspaz-8 üzerinden kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün aktivasyonunu gerçekleştirerek ekstrinsik ölüm yolağını tetiklediği tespit edilmiştir [103].

Kaspaz-3 aktivitesi değerlendirilen bileşiklerin ve referans grup olarak kullandığımız sisplatinin çalışmada kullanılan dört hücre hattında p53, kaspaz-3 ve aktin protein ifadeleri

üzerine etkisi western blotlama tekniği ile değerlendirilmiştir. Western blotlama sonucu elde edilen protein ifadeleri karşılaştırıldığında tripan mavisi, MTT, kaspaz-3 aktivite tayini yöntemleriyle elde edilen sonuçların daha net bir fotoğrafı elde edilmiştir. MTT sonuçları değerlendirildikten sonra Bileşik 6 ve 8 A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına 5 µg/mL olarak, Bileşik 9 Hep3B ve HCT116 hücre hatlarına 5 µg/mL olarak, Bileşik 4 Hep3B ve HCT116 hücre hatlarına 10 µg/mL olarak uygulanmıştır. Şekil 4.26'ya bakıldığında Bileşik 6 ve 8'in çok net bir şekilde kaspaz-3 ifadesini A549 hücre hattında sisplatinden daha iyi bir düzeyde artırdığı buna karşın sağlıklı hücre hattı olan BEAS-2B hücrelerinde sisplatine göre daha az ifade olduğu görülmüştür. Aynı şekilde Bileşik 6 ve 8'in p53 ifadesini A549 hücre hattında sisplatine göre daha fazla artırdıkları, BEAS-2B hücre hattında sisplatine göre daha az ifadesine yol açtıkları net bir şekilde görülmüştür. Bileşik 4 ve 9'un Hep3B ve HCT116 hücre hatlarında kaspaz protein ifadesine etkilerine bakıldığında özellikle Bileşik 4'ün Hep3B hücre hattında sisplatine göre belirgin bir şekilde kaspaz-3 ifadesini artırdığı görülmüştür. Bu iki bileşiğin HCT116 hücre hattında da kaspaz-3 ifadesini artırdıkları net bir şekilde görülmüştür. Western blotlama sonuçlarından özellikle Bileşik 6 ve 8'in A549 ve BEAS-2B hücre hatlarındaki p53 ve kaspaz-3 ifadesine etkilerine bakıldığında çalışmada kullanılan çinko ve kobalt içerikli bu benzimidazol bileşiklerin bir şekilde DNA stabilitesini bozarak apoptozun intrinsik yolağını aktive ettikleri görülmektedir. Bugüne kadar yapılan yine çinko ve kobalt içerikli benzimidazol bileşiklerinin bu sinyalizasyon yolağını kullanarak farklı kanser hücre hatlarında apoptozu tetikledikleri yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur [157, 158]. Yanı sıra çalışmada Bileşik 6 ve 8'in özellikle BEAS-2B hücre hattı üzerinde gösterdikleri düşük sitotoksikite bu maddeleri diğer benzimidazol türevi bileşiklerinin birçoğundan farklı olarak önemli bir kansere karşı ilaç potansiyeline sahip aday bileşikler olarak ön plana çıkarmaktadır.

Yapılan bir diğer çalışmada sentezlenen yeni bir çinko bazlı ligand koordinasyonlu benzimidazol polimeri kanserli lenfoma hücrelerine uygulanarak bu bileşiğin apoptotik sinyal yolağındaki etkisi incelenmiştir. Çinko bazlı polimer benzimidazol bileşik hematolojik kanser türlerinin klinik tedavisinde kullanılan bileşiklerden biri olan doksorubisinle sağlıklı T ve B lenfositlerinin olduğu lenfoma hücrelere birlikte uygulanmıştır. Uygulama sonucu kanserli lenfoma hücrelerindeki apoptotik hücre oranları çinko bazlı benzimidazol bileşik ve doksorubisin ayrı ayrı uygulandıklarında yaklaşık % 8-12 arasında belirlenirken bileşik ve doksorubisinin birlikte uygulandıkları hücrelerde apoptotik sürece giren hücre oranı yaklaşık % 60-70 oranında artmıştır. Aynı çalışmada p53 ve Bcl-2 protein ifadelerine de bakılmıştır. Çinko bazlı benzimidazol bileşik ve

doksorubisin karışımı, kanserli lenfoma hücrelerinde p53 ifadesini yaklaşık 4-5 kat artırırken, bu bileşik-doksorubisin karışımı bu hücrelerdeki Bcl-2 protein ifadesini yaklaşık 4-5 kat azaltmıştır. Bu sonuç çinko bazlı benzimidazol bileşik ve doksorubisinin çok hedefli (multitarget) kombine bir birleşik etkiye sahip olduğunu göstermiştir [130]. Bu çalışmada da kullanılan çinko ve kobalt bazlı maddelerin apoptotik yoldaki kaspaz-3 ve p53 ifadeleri üzerindeki etkilerine bakıldığında çalışılan maddelerin çok hedefli ilaçların geliştirilmesi ve daha etkili sonuçların alınabilmesi bakımından dikkate alınması gereken bileşikler olduklarını göstermektedir.

Farklı hücre hatlarında kaspaz-3 ve western blotlama yöntemleriyle farklı benzimidazol türevlerinin sitotoksik etkileri üzerine yapılan çalışmalarda benzimidazol türevi bileşiklerin apoptotik yolu tetikleyerek kanser hücreleri üzerinde etkili sitotoksik sonuçlar göstermiştir. Bu çalışmalardan bir tanesi de Ohno ve arkadaşlarının 4-(1H-1,3-benzodiazol-1-il) benzonitrilin antikanser aktivitesini inceledikleri çalışmada tespit edilmiştir. *In vitro* çalışmada, benzimidazol türevi bileşiğin hücre proliferasyonu, hücre döngüsü ilerlemesi ve apoptoz üzerindeki etkilerini değerlendirmek için ATP testleri, akış sitometrisi, western blot ve kaspaz-3/7 testleri kullanılmıştır. Sonuçlar bileşiğin kanser olmayan hücreler ve TIG-1-20 fibroblastlar üzerinde sitotoksik etki göstermediği hepatoblastoma hücre hattı HepG2 ve servikal kanser hücre hattı HEP-2'de hücre büyümesini inhibe ettiğini göstermiştir. Akış sitometrisi, western blot ve kaspaz-3/7 testleri, bileşiğin G1 fazı hücre döngüsü tutuklamasını indüklediğini ve ardından p53 (Ser15) ve p21 ekspresyonunu arttırdığını ortaya çıkarmıştır [159].

Çalışmada ortaya çıkan sonuçlar daha önce yapılmış olan araştırma sonuçları ile karşılaştırıldığında benzimidazol bileşiklerinin çağımızın vebasası olarak nitelendirilen kansere karşı metal bazlı ilaçların geliştirilmesinde umut vaat eden sonuçlar sergilemektedir. Bu çalışmada kullanılan bileşiklerin birçoğu üç kanser hücre hatları (A549, HCT116 ve Hep3B) üzerinde sitotoksik aktivite göstermiştir. Ancak Bileşik 4 ve 9'un HCT116 ve Hep3B hücre hatları üzerindeki etkinlikleri ve özellikle Bileşik 6 ve 8'in A549 hücre hattı üzerindeki yüksek sitotoksik etkinliği, buna karşın BEAS-2B sağlıklı hücre hattı üzerindeki düşük sitotoksik etkisi ilaç geliştirme çalışmalarının temel amacı olan; hedefe yönelik, organizmanın geneli için düşük sitotoksik etkiye ve düşük yan etkiye sahip ilaç geliştirme amacı için oldukça yüksek potansiyele sahip olduklarını göstermiştir. Bu bileşiklerin sitotoksik etkileri yanında antimikrobiyal etkilerinin de test edildiği MİK çalışmaları bu bileşiklerden bazılarının (Bileşik 4, 6, 8 ve 9) bakteri ve mayalara karşı etkili ilaçlar geliştirmek için benzimidazol türevi bileşiklerin bir potansiyele sahip



olduklarını göstermiştir. Bu bileşiklerin Tripan Mavisi, MTT ve Kaspaz-3 aktivite tayinleri sonuçlarının son olarak net bir fotoğrafı diyebileceğimiz western blotlama görüntüleri (Şekil 4.26) bu bileşiklerin neden etkili ve ilerisi için çalışılmaya değer bileşikler olduğunun açık bir resmi gibidir. İlerisi için özellikle apoptotik yolda ve diğer hücre içi sinyalizasyondaki etkinliklerinin daha detaylı araştırılması bu bileşiklerin hedefe yönelik ilaç geliştirme açısından daha etkili kullanılabileceğini göstermektedir. Bu amaçla bu bileşikler için patent başvuru yapılmış olup belirtilen bu ileri çalışmalar için ilk olarak hayvan deneyleri (*in vivo*) yapılması gerekmektedir.



## 6. KAYNAKLAR

- [1] **Url-1**<<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>>, date retrieved 18.04.2020.
- [2] **Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J.W., Comber, H., Forman, D. ve Bray, F.** (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012, *Eur J Cancer*. **49** (6), 1374-403.
- [3] **Plummer, M., de Martel, C., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F. ve Franceschi, S.** (2016). Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis, *Lancet Glob Health*. **4** (9), e609-16.
- [4] **Url-2**<<https://www.hastane.deu.edu.tr/index.php/kurumsal.html?id=1992>>, date retrieved 30.06.2021
- [5] **Url-3**<Available from: <https://www.statista.com/statistics/696208/oncology-costs-worldwide/h>>, date retrieved 30.06.2021
- [6] **Url-4**<<https://gco.iarc.fr/>>, date retrieved 01.07.2021
- [7] **Url-5**< <https://www.aa.com.tr/tr/saglik/interaktif-rakamlarla-dunyada-ve-turkiye-de-kanser-vakalari/1383259>>, date retrieved 01.07.2021
- [8] **Url-6**<<https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser>>, date retrieved 02.07.2021
- [9] **Hanahan, D. ve Weinberg, R.A.** (2000). The hallmarks of cancer, *Cell*. **100** (1), 57-70.
- [10] **Hanahan, D. ve Weinberg, R.A.** (2011). Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*. **144** (5), 646-74.
- [11] **Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A. ve Moses, H.L.** (2008). Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion, *Mol Cancer Res*. **6** (10), 1521-33.
- [12] **Lemmon, M.A. ve Schlessinger, J.** (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases, *Cell*. **141** (7), 1117-34.
- [13] **Bhowmick, N.A., Neilson, E.G. ve Moses, H.L.** (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression, *Nature*. **432** (7015), 332-7.
- [14] **Jiang, B.H. ve Liu, L.Z.** (2009). PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis, *Adv Cancer Res*. **102**, 19-65.

- [15] **Yuan, T.L. ve Cantley, L.C.** (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme, *Oncogene*. **27** (41), 5497-510.
- [16] **Neuzillet, C., Tijeras-Raballand, A., Cohen, R., Cros, J., Faivre, S., Raymond, E. ve de Gramont, A.** (2015). Targeting the TGFbeta pathway for cancer therapy, *Pharmacol Ther*. **147**, 22-31.
- [17] **Inoue, Y. ve Imamura, T.** (2008). Regulation of TGF-beta family signaling by E3 ubiquitin ligases, *Cancer Sci*. **99** (11), 2107-12.
- [18] **Burkhardt, D.L. ve Sage, J.** (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene, *Nat Rev Cancer*. **8** (9), 671-82.
- [19] **Deshpande, A., Sicinski, P. ve Hinds, P.W.** (2005). Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective, *Oncogene*. **24** (17), 2909-15.
- [20] **Sherr, C.J. ve McCormick, F.** (2002). The RB and p53 pathways in cancer, *Cancer Cell*. **2** (2), 103-12.
- [21] **Agrawal, A., Yang, J., Murphy, R.F. ve Agrawal, D.K.** (2006). Regulation of the p14ARF-Mdm2-p53 pathway: an overview in breast cancer, *Exp Mol Pathol*. **81** (2), 115-22.
- [22] **Bourdon, J.C., Khoury, M.P., Diot, A., Baker, L., Fernandes, K., Aoubala, M., Quinlan, P., Purdie, C.A., Jordan, L.B., Prats, A.C., Lane, D.P. ve Thompson, A.M.** (2011). p53 mutant breast cancer patients expressing p53gamma have as good a prognosis as wild-type p53 breast cancer patients, *Breast Cancer Res*. **13** (1), R7.
- [23] **Adams, J.M. ve Cory, S.** (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy, *Oncogene*. **26** (9), 1324-37.
- [24] **Wu, X., Amos, C.I., Zhu, Y., Zhao, H., Grossman, B.H., Shay, J.W., Luo, S., Hong, W.K. ve Spitz, M.R.** (2003). Telomere dysfunction: a potential cancer predisposition factor, *J Natl Cancer Inst*. **95** (16), 1211-8.
- [25] **Zhao, D., Pan, C., Sun, J., Gilbert, C., Drews-Elger, K., Azzam, D.J., Picon-Ruiz, M., Kim, M., Ullmer, W., El-Ashry, D., Creighton, C.J. ve Slingerland, J.M.** (2015). VEGF drives cancer-initiating stem cells through VEGFR-2/Stat3 signaling to upregulate Myc and Sox2, *Oncogene*. **34** (24), 3107-19.
- [26] **Oliver, M. ve Waxman, E.S.**(2019). The role of anti-angiogenic agents (VEGF), in targeted therapies in lung cancer, *Management Strategies for Nurses and Practitioners*. 85-104.

- [27] **Hanahan, D. ve Folkman, J.** (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis, *Cell*. **86** (3), 353-64.
- [28] **Poste, G. ve Fidler, I.J.** (1980). The pathogenesis of cancer metastasis, *Nature*. **283** (5743), 139-46.
- [29] **Lee, J.H., Miele, M.E., Hicks, D.J., Phillips, K.K., Trent, J.M., Weissman, B.E. ve Welch, D.R.** (1996). KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene, *J Natl Cancer Inst*. **88** (23), 1731-7.
- [30] **Semaan, S.J. ve Kauffman, A.S.** (2013). Emerging concepts on the epigenetic and transcriptional regulation of the Kiss1 gene, *Int J Dev Neurosci*. **31** (6), 452-62.
- [31] **Warburg, O.** (1956). On respiratory impairment in cancer cells, *Science*. **124** (3215), 269-70.
- [32] **Warburg, O.** (1956). On the origin of cancer cells, *Science*. **123** (3191), 309-14.
- [33] **Url-7**<[https://www.pinterest.ch/pin/643944446690083622/?amp\\_client\\_id=](https://www.pinterest.ch/pin/643944446690083622/?amp_client_id=)>, date retrieved 17.01.2020.
- [34] **Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C. ve Thompson, C.B.** (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation, *Science*. **324** (5930), 1029-33.
- [35] **Teng, M.W., Swann, J.B., Koebel, C.M., Schreiber, R.D. ve Smyth, M.J.** (2008). Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer, *J Leukoc Biol*. **84** (4), 988-93.
- [36] **Kim, R., Emi, M. ve Tanabe, K.** (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape, *Immunology*. **121** (1), 1-14.
- [37] **Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H. ve Parks, W.P.** (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors, *J Natl Cancer Inst*. **51** (5), 1417-23.
- [38] **Cooper, J.R., Abdullatif, M.B., Burnett, E.C., Kempell, K.E., Conforti, F., Tolley, H., Collins, J.E. ve Davies, D.E.** (2016). Long term culture of the A549 cancer cell line promotes multilamellar body formation and differentiation towards an alveolar Type II Pneumocyte Phenotype, *PLoS One*. **11** (10), e0164438.
- [39] **Han, X., Na, T., Wu, T. ve Yuan, B.Z.** (2020). Human lung epithelial BEAS-2B cells exhibit characteristics of mesenchymal stem cells, *PLoS One*. **15** (1), e0227174.

- [40] **Calvisi, D.F., Ladu, S., Gorden, A., Farina, M., Conner, E.A., Lee, J.S., Factor, V.M. ve Thorgeirsson, S.S.** (2006). Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC, *Gastroenterology*. **130** (4), 1117-28.
- [41] **Qiu, G.H., Xie, X., Xu, F., Shi, X., Wang, Y. ve Deng, L.** (2015). Distinctive pharmacological differences between liver cancer cell lines HepG2 and Hep3B, *Cytotechnology*. **67** (1), 1-12.
- [42] **Url-8** <<https://www.wcf.org/dieatandcancer/cancer-trends/colorectal-cancer-statistic>>, date retrieved 09.11.2020
- [43] **He, J., Liang, X., Luo, F., Chen, X., Xu, X., Wang, F. ve Zhang, Z.** (2016). P53 Is involved in a Three-Dimensional Architecture-Mediated decrease in chemosensitivity in colon cancer, *J Cancer*. **7** (8), 900-9.
- [44] **Berg, D., Buchel, K.H., Plempel, M. ve Zywiets, A.** (1986). Action mechanisms of cell-division-arresting benzimidazoles and of sterol biosynthesis-inhibiting imidazoles, 1,2,4-triazoles, and pyrimidines, *Mykosen*. **29** (5), 221-9.
- [45] **Hranjec, M., Starcevic, K., Pavelic, S.K., Lucin, P., Pavelic, K. ve Karminski Zamola, G.** (2011). Synthesis, spectroscopic characterization and antiproliferative evaluation in vitro of novel Schiff bases related to benzimidazoles, *Eur J Med Chem*. **46** (6), 2274-9.
- [46] **Haugwitz, R.D., Angel, R.G., Jacobs, G.A., Maurer, B.V., Narayanan, V.L., Cruthers, L.R. ve Szanto, J.** (1982). Antiparasitic agents. 5. Synthesis and anthelmintic activities of novel 2-heteroaromatic-substituted isothiocyanatobenzoxazoles and benzothiazoles, *J Med Chem*. **25** (8), 969-74.
- [47] **Paul, A., Anbu, S., Sharma, G., Kuznetsov, M.L., Koch, B., Guedes da Silva, M.F. ve Pombeiro, A.J.** (2015). Synthesis, DNA binding, cellular DNA lesion and cytotoxicity of a series of new benzimidazole-based Schiff base copper(II) complexes, *Dalton Trans*. **44** (46), 19983-96.
- [48] **Chandrika, N.T., Shrestha, S.K., Ngo, H.X. ve Garneau-Tsodikova, S.** (2016). Synthesis and investigation of novel benzimidazole derivatives as antifungal agents, *Bioorg Med Chem*. **24** (16), 3680-6.
- [49] **Padalkar, V.S., Patil, V.S., Gupta, V.D., Phatangare, K.R., Umape, P.G. ve Sekar, N.** (2011). Synthesis, characterization, thermal properties, and antimicrobial activities of 5-(Diethylamino)-2-(5-nitro-1H-benzimidazol-2-yl)phenol and its transition metal complexes, *ISRN Org Chem*. **2011**, 738361.

- [50] Vausselin, T., Seron, K., Lavie, M., Mesalam, A.A., Lemasson, M., Belouzard, S., Feneant, L., Danneels, A., Rouille, Y., Cocquerel, L., Foquet, L., Rosenberg, A.R., Wychowski, C., Meuleman, P., Melnyk, P. ve Dubuisson, J. (2016). Identification of a new benzimidazole derivative as an antiviral against hepatitis C virus, *J Virol.* **90** (19), 8422-34.
- [51] Fonkui, T.Y., Ikhile, M.I., Njobeh, P.B. ve Ndinteh, D.T. (2019). Benzimidazole Schiff base derivatives: synthesis, characterization and antimicrobial activity, *BMC Chem.* **13** (1), 127.
- [52] Hollomon, D.W., Butters, J.A., Barker, H. ve Hall, L. (1998). Fungal beta-tubulin, expressed as a fusion protein, binds benzimidazole and phenylcarbamate fungicides, *Antimicrob Agents Chemother.* **42** (9), 2171-3.
- [53] Knudson, S.E., Awasthi, D., Kumar, K., Carreau, A., Goullieux, L., Lagrange, S., Vermet, H., Ojima, I. ve Slayden, R.A. (2014). A trisubstituted benzimidazole cell division inhibitor with efficacy against *Mycobacterium tuberculosis*, *PLoS One.* **9** (4), e93953.
- [54] Kale, R.R., Kale, M.G., Waterson, D., Raichurkar, A., Hameed, S.P., Manjunatha, M.R., Kishore Reddy, B.K., Malolanarasimhan, K., Shinde, V., Koushik, K., Jena, L.K., Menasinakai, S., Humnabadkar, V., Madhavapeddi, P., Basavarajappa, H., Sharma, S., Nandishaiah, R., Mahesh Kumar, K.N., Ganguly, S., Ahuja, V., Gaonkar, S., Naveen Kumar, C.N., Ogg, D., Boriack-Sjodin, P.A., Sambandamurthy, V.K., de Sousa, S.M. ve Ghorpade, S.R. (2014). Thiazolopyridone ureas as DNA gyrase B inhibitors: optimization of antitubercular activity and efficacy, *Bioorg Med Chem Lett.* **24** (3), 870-9.
- [55] Bansal, S., Sinha, D., Singh, M., Cheng, B., Tse-Dinh, Y.C. ve Tandon, V. (2012). 3,4-dimethoxyphenyl bis-benzimidazole, a novel DNA topoisomerase inhibitor that preferentially targets *Escherichia coli* topoisomerase I, *J Antimicrob Chemother.* **67** (12), 2882-91.
- [56] Sambanthamoorthy, K., Gokhale, A.A., Lao, W., Parashar, V., Neiditch, M.B., Semmelhack, M.F., Lee, I. ve Waters, C.M. (2011). Identification of a novel benzimidazole that inhibits bacterial biofilm formation in a broad-spectrum manner, *Antimicrob Agents Chemother.* **55** (9), 4369-78.

- [57] **AlAjmi, M.F., Hussain, A., Rehman, M.T., Khan, A.A., Shaikh, P.A. ve Khan, R.A.** (2018). Design, synthesis, and biological evaluation of benzimidazole-derived biocompatible copper(II) and zinc(II) complexes as anticancer chemotherapeutics, *International Journal of Molecular Sciences*. **19** (5).
- [58] **Alpan, A.S., Gunes, H.S. ve Topcu, Z.** (2007). 1H-Benzimidazole derivatives as mammalian DNA topoisomerase I inhibitors, *Acta Biochim Pol.* **54** (3), 561-5.
- [59] **Tolner, B., Hartley, J.A. ve Hochhauser, D.** (2001). Transcriptional regulation of topoisomerase II alpha at confluence and pharmacological modulation of expression by bis-benzimidazole drugs, *Mol Pharmacol.* **59** (4), 699-706.
- [60] **Habala, L., Bartel, C., Giester, G., Jakupec, M.A., Keppler, B.K. ve Rompel, A.** (2015). Complexes of N-hydroxyethyl-N benzimidazolymethylethylenediaminediacetic acid with group 12 metals and vanadium-Synthesis, structure and bioactivity of the vanadium complex, *J Inorg Biochem.* **147**, 147-52.
- [61] **Wang, W., Kong, D., Cheng, H., Tan, L., Zhang, Z., Zhuang, X., Long, H., Zhou, Y., Xu, Y., Yang, X. ve Ding, K.** (2014). New benzimidazole-2-urea derivatives as tubulin inhibitors, *Bioorg Med Chem Lett.* **24** (17), 4250-3.
- [62] **Taha, M., Ismail, N.H., Imran, S., Selvaraj, M., Rahim, A., Ali, M., Siddiqui, S., Rahim, F. ve Khan, K.M.** (2015). Synthesis of novel benzohydrazone-oxadiazole hybrids as beta-glucuronidase inhibitors and molecular modeling studies, *Bioorg Med Chem.* **23** (23), 7394-404.
- [63] **Chu, B., Liu, F., Li, L., Ding, C., Chen, K., Sun, Q., Shen, Z., Tan, Y., Tan, C. ve Jiang, Y.** (2015). A benzimidazole derivative exhibiting antitumor activity blocks EGFR and HER2 activity and upregulates DR5 in breast cancer cells, *Cell Death Dis.* **6**, e1686.
- [64] **Shrivastava, N., Naim, M.J., Alam, M.J., Nawaz, F., Ahmed, S. ve Alam, O.** (2017). Benzimidazole scaffold as anticancer agent: synthetic approaches and structure-activity relationship, *Arch Pharm (Weinheim).* **350** (6).
- [65] **Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R. ve Berneman, Z.N.** (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer, *Cell Prolif.* **36** (3), 131-49.
- [66] **Vermeulen, K., Berneman, Z.N. ve Van Bockstaele, D.R.** (2003). Cell cycle and apoptosis, *Cell Prolif.* **36** (3), 165-75.
- [67] **Url-9**<[http://www.biology.arizona.edu/cell\\_bio/tutorials/cell\\_cycle/cells2.html](http://www.biology.arizona.edu/cell_bio/tutorials/cell_cycle/cells2.html)>, date retrieved 03.12.2020.

- [68] **Weinberg, R.A.** (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control, *Cell*. **81** (3), 323-30.
- [69] **Collins, K., Jacks, T. ve Pavletich, N.P.** (1997). The cell cycle and cancer, *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94** (7), 2776-8.
- [70] **Shan, Y.S., Hsu, H.P., Lai, M.D., Hung, Y.H., Wang, C.Y., Yen, M.C. ve Chen, Y.L.** (2017). Cyclin D1 overexpression correlates with poor tumor differentiation and prognosis in gastric cancer, *Oncol Lett*. **14** (4), 4517-4526.
- [71] **Law, M.E., Corsino, P.E., Narayan, S. ve Law, B.K.** (2015). Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors as anticancer therapeutics, *Mol Pharmacol*. **88** (5), 846-52.
- [72] **Mantovani, F., Collavin, L. ve Del Sal, G.** (2019). Mutant p53 as a guardian of the cancer cell, *Cell Death Differ*. **26** (2), 199-212.
- [73] **Kerr, J.F., Wyllie, A.H. ve Currie, A.R.** (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer*. **26** (4), 239-57.
- [74] **Elmore, S.** (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicol Pathol*. **35** (4), 495-516.
- [75] **Wong, R.S.** (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment, *J Exp Clin Cancer Res*. **30**, 87.
- [76] **Url-10**<<https://www.slideshare.net/prathisharajamani/apoptosis-75349738>>,date retrieved 04.11.2020.
- [77] **Akşit, H. ve Bildik, A.** (2008). Apoptosis, *YYÜ VET FAK DERG*. **19(1)**, 55-63.
- [78] **Kasibhatla, S. ve Tseng, B.** (2003). Why target apoptosis in cancer treatment?, *Mol Cancer Ther*. **2** (6), 573-80.
- [79] **Locksley, R.M., Killeen, N. ve Lenardo, M.J.** (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology, *Cell*. **104** (4), 487-501.
- [80] **Jiang, Y., Woronicz, J.D., Liu, W. ve Goeddel, D.V.** (1999). Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains, *Science*. **283** (5401), 543-6.
- [81] **Szegezdi, E., Fitzgerald, U. ve Samali, A.** (2003). Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far, *Ann N Y Acad Sci*. **1010**, 186-94.
- [82] **Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A. ve D'Orazi, G.** (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies, *Aging (Albany NY)*. **8** (4), 603-19.



- [83] **Hornsby, P.J. ve Didenko, V.V.** (2002). In situ DNA ligation as a method for labeling apoptotic cells in tissue sections. An overview, *Methods Mol Biol.* **203**, 133-41.
- [84] **Bildik, A. ve Bayar, İ.** (2018). Inhibition of apoptotic pathways in cancer, *Turkiye Klinikleri J Vet* **9(2)**, 42-51.
- [85] **Osellame, L.D., Blacker, T.S. ve Duchon, M.R.** (2012). Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function, *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* **26** (6), 711-23.
- [86] **Minn, A.J., Velez, P., Schendel, S.L., Liang, H., Muchmore, S.W., Fesik, S.W., Fill, M. ve Thompson, C.B.** (1997). Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes, *Nature.* **385** (6614), 353-7.
- [87] **Miquel, C., Borrini, F., Grandjouan, S., Auperin, A., Viguier, J., Velasco, V., Duvillard, P., Praz, F. ve Sabourin, J.C.** (2005). Role of bax mutations in apoptosis in colorectal cancers with microsatellite instability, *Am J Clin Pathol.* **123** (4), 562-70.
- [88] **Urist, M. ve Prives, C.** (2002). p53 leans on its siblings, *Cancer Cell.* **1** (4), 311-3.
- [89] **Vousden, K.H. ve Lu, X.** (2002). Live or let die: the cell's response to p53, *Nat Rev Cancer.* **2** (8), 594-604.
- [90] **Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y. ve Taya, Y.** (2000). p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53, *Cell.* **102** (6), 849-62.
- [91] **Chen, X., Wang, T., Yang, D., Wang, J., Li, X., He, Z., Chen, F., Che, X. ve Song, X.** (2013). Expression of the IAP protein family acts cooperatively to predict prognosis in human bladder cancer patients, *Oncol Lett.* **5** (4), 1278-1284.
- [92] **McIlwain, D.R., Berger, T. ve Mak, T.W.** (2013). Caspase functions in cell death and disease, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **5** (4), a008656.
- [93] **Ghavami, S., Hashemi, M., Ande, S.R., Yeganeh, B., Xiao, W., Eshraghi, M., Bus, C.J., Kadkhoda, K., Wiechec, E., Halayko, A.J. ve Los, M.** (2009). Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes, *J Med Genet.* **46** (8), 497-510.
- [94] **Ishimura, N., Isomoto, H., Bronk, S.F. ve Gores, G.J.** (2006). Trail induces cell migration and invasion in apoptosis-resistant cholangiocarcinoma cells, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **290** (1), G129-36.

- [95] **Takeda, K., Stagg, J., Yagita, H., Okumura, K. ve Smyth, M.J.** (2007). Targeting death-inducing receptors in cancer therapy, *Oncogene*. **26** (25), 3745-57.
- [96] **Friesen, C., Fulda, S. ve Debatin, K.M.** (1997). Deficient activation of the CD95 (APO-1/Fas) system in drug-resistant cells, *Leukemia*. **11** (11), 1833-41.
- [97] **Fulda, S.** (2010). Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer, *Int J Cell Biol*. **2010**, 370835.
- [98] **Url-11**<<https://www.novusbio.com/antibody-news/antibodies/caspase-3-a-marker-of-programmed-cell-death.>>, date retrieved 23.01.2021
- [99] **Liu, P.F., Hu, Y.C., Kang, B.H., Tseng, Y.K., Wu, P.C., Liang, C.C., Hou, Y.Y., Fu, T.Y., Liou, H.H., Hsieh, I.C., Ger, L.P. ve Shu, C.W.** (2017). Expression levels of cleaved caspase-3 and caspase-3 in tumorigenesis and prognosis of oral tongue squamous cell carcinoma, *PLoS One*. **12** (7), e0180620.
- [100] **Porter, A.G. ve Janicke, R.U.** (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis, *Cell Death Differ*. **6** (2), 99-104.
- [101] **Akhtar, M.J., Khan, A.A., Ali, Z., Dewangan, R.P., Rafi, M., Hassan, M.Q., Akhtar, M.S., Siddiqui, A.A., Partap, S., Pasha, S. ve Yar, M.S.** (2018). Synthesis of stable benzimidazole derivatives bearing pyrazole as anticancer and EGFR receptor inhibitors, *Bioorganic Chemistry*. **78**, 158-169.
- [102] **Certal, V., Halley, F., Virone-Oddos, A., Delorme, C., Karlsson, A., Rak, A., Thompson, F., Filoche-Romme, B., El-Ahmad, Y., Carry, J.C., Abecassis, P.Y., Lejeune, P., Vincent, L., Bonnevaux, H., Nicolas, J.P., Bertrand, T., Marquette, J.P., Michot, N., Benard, T., Below, P., Vade, I., Chatreaux, F., Lebourg, G., Pilorge, F., Angouillant-Boniface, O., Louboutin, A., Lengauer, C. ve Schio, L.** (2012). Discovery and optimization of new benzimidazole- and benzoxazole-pyrimidone selective PI3K beta inhibitors for the treatment of phosphatase and TENsin homologue (PTEN)-deficient cancers, *Journal of Medicinal Chemistry*. **55** (10), 4788-4805.
- [103] **Chen, K., Chu, B.Z., Liu, F., Li, B., Gao, C.M., Li, L.L., Sun, Q.S., Shen, Z.F. ve Jiang, Y.Y.** (2015). New benzimidazole acridine derivative induces human colon cancer cell apoptosis in vitro via the ROS-JNK signaling pathway, *Acta Pharmacol Sin*. **36** (9), 1074-84.
- [104] **Gangrade, A., Pathak, V., Augelli-Szafran, C.E., Wei, H.X., Oliver, P., Suto, M. ve Buchsbaum, D.J.** (2018). Preferential inhibition of Wnt/beta-Catenin signaling

- by novel benzimidazole compounds in triple-negative breast cancer, *Int J Mol Sci.* **19** (5).
- [105] **He, L.J., Yang, D.L., Li, S.Q., Zhang, Y.J., Tang, Y., Lei, J., Frett, B., Lin, H.K., Li, H.Y., Chen, Z.Z. ve Xu, Z.G.** (2018). Facile construction of fused benzimidazole-isoquinolinones that induce cell-cycle arrest and apoptosis in colorectal cancer cells, *Bioorg Med Chem.* **26** (14), 3899-3908.
- [106] **Nayak, V.L., Nagesh, N., Ravikumar, A., Bagul, C., Vishnuvardhan, M., Srinivasulu, V. ve Kamal, A.** (2017). 2-aryl benzimidazole conjugate induced apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through caspase independent pathway, *Apoptosis.* **22** (1), 118-134.
- [107] **Zhao, J., Zhi, S.G., Yu, H.B., Mao, R.N., Hu, J.Y., Song, W. ve Zhang, J.S.** (2017). Mitochondrial and nuclear DNA dual damage induced by 2-(2'-quinoly) benzimidazole copper complexes with potential anticancer activity, *Rsc Advances.* **7** (81), 51162-51174.
- [108] **Yurttas, L., Demirayak, S., Ciftci, G.A., Yildirim, S.U. ve Kaplancikli, Z.A.** (2013). Synthesis and biological evaluation of some 1,2-Disubstituted benzimidazole derivatives as new potential anticancer agents, *Archiv Der Pharmazie.* **346** (5), 403-414.
- [109] **Apohan, E., Yilmaz, U., Yilmaz, O., Serindag, A., Kucukbay, H., Yesilada, O. ve Baran, Y.** (2017). Synthesis, cytotoxic and antimicrobial activities of novel cobalt and zinc complexes of benzimidazole derivatives, *Journal of Organometallic Chemistry.* **828**, 52-58.
- [110] **Ansari, K.F. ve Lal, C.** (2009). Synthesis, physicochemical properties and antimicrobial activity of some new benzimidazole derivatives, *European Journal of Medicinal Chemistry.* **44** (10), 4028-4033.
- [111] **Ashok, D., Gundu, S., Aamate, V.K. ve Devulapally, M.G.** (2018). Conventional and microwave-assisted synthesis of new indole-tethered benzimidazole-based 1,2,3-triazoles and evaluation of their antimycobacterial, antioxidant and antimicrobial activities, *Molecular Diversity.* **22** (4), 769-778.
- [112] **Ayhan-Kilcigil, G., Tuncbilek, M., Altanlar, N. ve Goker, H.** (1999). Synthesis and antimicrobial activity of some new benzimidazole carboxylates and carboxamides, *Farmaco.* **54** (8), 562-5.
- [113] **Beulah, K., Kumar, A.R., Lingaiah, B.P.V., Rao, P.S., Narsaiah, B., Reddy, A.S.K. ve Murty, U.S.N.** (2015). Design, synthesis and biological evaluation of

- benzimidazole-pyridine-piperidine hybrids as a new class of potent antimicrobial agents, *Letters in Drug Design & Discovery*. **12** (1), 38-45.
- [114] **Blaszczak-Swiatkiewicz, K., Olszewska, P. ve Mikiciuk-Olasik, E.** (2014). Biological approach of anticancer activity of new benzimidazole derivatives, *Pharmacological Reports*. **66** (1), 100-106.
- [115] **Cetinkaya, E., Alici, B., Gok, Y., Durmaz, R. ve Gunal, S.** (1999). New derivatives of benzimidazole and their antimicrobial activity, *Journal of Chemotherapy*. **11** (2), 83-89.
- [116] **Kucukbay, H., Yilmaz, U., Sireci, N. ve Onganer, A.N.** (2011). Synthesis and antimicrobial activities of some bridged bis-benzimidazole derivatives, *Turkish Journal of Chemistry*. **35** (4), 561-571.
- [117] **Yurttas, L., Ozkay, Y., Karaca, H., Tunali, Y. ve Kaplancikli, Z.A.** (2013). Synthesis and antimicrobial evaluation of some 2,5-disubstituted benzimidazole derivatives, *Letters in Drug Design & Discovery*. **10** (6), 486-491.
- [118] **Praveen, P.A., Babu, R.R., Balaji, P., Murugadas, A. ve Akbarsha, M.A.** (2018). Laser assisted anticancer activity of benzimidazole based metal organic nanoparticles, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*. **180**, 218-224.
- [119] **Qi, Y.Y., Gan, Q., Liu, Y.X., Xiong, Y.H., Mao, Z.W. ve Le, X.Y.** (2018). Two new Cu(II) dipeptide complexes based on 5-methyl-2-(2'-pyridyl) benzimidazole as potential antimicrobial and anticancer drugs: Special exploration of their possible anticancer mechanism, *European Journal of Medicinal Chemistry*. **154**, 220-232.
- [120] **Qiao, X., Ma, Z.Y., Shao, J., Bao, W.G., Xu, J.Y., Qiang, Z.Y. ve Lou, J.S.** (2014). Biological evaluation of a cytotoxic 2-substituted benzimidazole copper(II) complex: DNA damage, antiproliferation and apoptotic induction activity in human cervical cancer cells, *Biometals*. **27** (1), 155-172.
- [121] **Ustun, E., Ozgur, A., Coskun, K.A., Demir, S., Ozdemir, I. ve Tutar, Y.** (2016). CO-releasing properties and anticancer activities of manganese complexes with imidazole/benzimidazole ligands, *Journal of Coordination Chemistry*. **69** (22), 3384-3394.
- [122] **Reddy, T.S., Kulhari, H., Reddy, V.G., Bansal, V., Kamal, A. ve Shukla, R.** (2015). Design, synthesis and biological evaluation of 1,3-diphenyl-1H-pyrazole

derivatives containing benzimidazole skeleton as potential anticancer and apoptosis inducing agents, *European Journal of Medicinal Chemistry*. **101**, 790-805.

- [123] **Chhajed, S.S., Sonawane, S.S., Upasani, C.D., Kshirsagar, S.J. ve Gupta, P.P.** (2016). Design, synthesis and molecular modeling studies of few chalcone analogues of benzimidazole for epidermal growth factor receptor inhibitor in search of useful anticancer agent, *Computational Biology and Chemistry*. **61**, 138-144.
- [124] **Farmanzadeh, D. ve Najafi, M.** (2015). Benzimidazole derivatives as anticancer drugs: A theoretical investigation, *Journal of Theoretical & Computational Chemistry*. **14** (3).
- [125] **Hsu, M.H., Hsu, S.M., Kuo, Y.C., Liu, C.Y., Hsieh, C.Y., Twu, Y.C., Wang, C.K., Wang, Y.H. ve Liao, Y.J.** (2017). Treatment with low-dose sorafenib in combination with a novel benzimidazole derivative bearing a pyrrolidine side chain provides synergistic antiproliferative effects against human liver cancer, *Rsc Advances*. **7** (26), 16253-16263.
- [126] **Kamal, A., Kumar, G.B., Nayak, V.L., Reddy, V.S., Shaik, A.B., Rajender ve Reddy, M.K.** (2015). Design, synthesis and biological evaluation of imidazopyridine/imidazopyrimidine-benzimidazole conjugates as potential anticancer agents, *Medchemcomm*. **6** (4), 606-612.
- [127] **Badawey, E.A.M. ve Kappe, T.** (1995). Benzimidazole condensed ring-systems .10. synthesis and cytotoxic activity of some pyrido[1,2-a]benzimidazoles, *Farmaco*. **50** (7-8), 537-542.
- [128] **Bistrovic, A., Krstulovic, L., Harej, A., Grbcic, P., Sedic, M., Kostrun, S., Pavelic, S.K., Bajic, M. ve Raic-Malic, S.** (2018). Design, synthesis and biological evaluation of novel benzimidazole amidines as potent multi-target inhibitors for the treatment of non-small cell lung cancer, *European Journal of Medicinal Chemistry*. **143**, 1616-1634.
- [129] **Vlaicu, I.D., Olar, R., Maxim, M., Chifiriuc, M.C., Bleotu, C., Stănică, N., Scătețeanu, G.V., Dulea, C., Avram, S. ve Badea, M.** (2019). Evaluating the biological potential of some new cobalt (II) complexes with acrylate and benzimidazole derivatives, *Appl Organometal Chem.*, **33** (7).

- [130] **Han, X.-S., Li, T., Zhang, X.-A. ve Lu, J.** (2020). A new 3D zinc (II)-coordination polymer: treatment activity on lymphoma combined with doxorubicin via regulating apoptotic genes expression, *Inorganic and Nano-Metal Chemistry*.
- [131] **Dokla, E.M.E., Abutaleb, N.S., Milik, S.N., Li, D., El-Baz, K., Shalaby, M.W., Al-Karaki, R., Nasr, M., Klein, C.D., Abouzid, K.A.M. ve Seleem, M.N.** (2020). Development of benzimidazole-based derivatives as antimicrobial agents and their synergistic effect with colistin against gram-negative bacteria, *Eur J Med Chem.* **186**, 111850.
- [132] **Lopez-Sandoval, H., Londono-Lemos, M.E., Garza-Velasco, R., Poblano-Melendez, I., Granada-Macias, P., Gracia-Mora, I. ve Barba-Behrens, N.** (2008). Synthesis, structure and biological activities of cobalt(II) and zinc(II) coordination compounds with 2-benzimidazole derivatives, *J Inorg Biochem.* **102** (5-6), 1267-76.
- [133] **Noha, R.M., Abdelhameid, M.K., Ismail, M.M., Mohammed, M.R. ve Salwa, E.** (2021). Design, synthesis and screening of benzimidazole containing compounds with methoxylated aryl radicals as cytotoxic molecules on (HCT-116) colon cancer cells, *Eur J Med Chem.* **209**, 112870.
- [134] **Strober, W.** (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability, *Curr Protoc Immunol.* **111**, A3 B 1-A3 B 3.
- [135] **Stockert, J.C., Horobin, R.W., Colombo, L.L. ve Blazquez-Castro, A.** (2018). Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives, *Acta Histochem.* **120** (3), 159-167.
- [136] **Riesselman, M.H., Hazen, K.C. ve Cutler, J.E.** (2000). Determination of antifungal MICs by a rapid susceptibility assay, *J Clin Microbiol.* **38** (1), 333-40.
- [137] **Hug, H., Los, M., Hirt, W. ve Debatin, K.M.** (1999). Rhodamine 110-linked amino acids and peptides as substrates to measure caspase activity upon apoptosis induction in intact cells, *Biochemistry.* **38** (42), 13906-11.
- [138] **Jones, J., Heim, R., Hare, E., Stack, J. ve Pollok, B.A.** (2000). Development and application of a GFP-FRET intracellular caspase assay for drug screening, *J Biomol Screen.* **5** (5), 307-18.
- [139] **Wang, Z.Q., Liao, J. ve Diwu, Z.** (2005). N-DEVD-N'-morpholinecarbonyl-rhodamine 110: novel caspase-3 fluorogenic substrates for cell-based apoptosis assay, *Bioorg Med Chem Lett.* **15** (9), 2335-8.

- [140] **Paul, K., Bindal, S. ve Luxami, V.** (2013). Synthesis of new conjugated coumarin-benzimidazole hybrids and their anticancer activity, *Bioorg Med Chem Lett.* **23** (12), 3667-72.
- [141] **Yadav, S., Narasimhan, B., Lim, S.M., Ramasamy, K., Vasudevan, M., Shah, S.A.A. ve Selvaraj, M.** (2017). Synthesis, characterization, biological evaluation and molecular docking studies of 2-(1H-benzo[d]imidazol-2-ylthio)-N-(substituted 4-oxothiazolidin-3-yl) acetamides, *Chem Cent J.* **11** (1), 137.
- [142] **Srour, A.M., Ahmed, N.S., Abd El-Karim, S.S., Anwar, M.M. ve El-Hallouty, S.M.** (2020). Design, synthesis, biological evaluation, QSAR analysis and molecular modelling of new thiazol-benzimidazoles as EGFR inhibitors, *Bioorg Med Chem.* **28** (18), 115657.
- [143] **Sridhar Goud, N., Pooladanda, V., Muni Chandra, K., Lakshmi Soukya, P.S., Alvala, R., Kumar, P., Nagaraj, C., Dawn Bharath, R., Qureshi, I.A., Godugu, C. ve Alvala, M.** (2020). Novel benzimidazole-triazole hybrids as apoptosis inducing agents in lung cancer: Design, synthesis, (18)F-radiolabeling & galectin-1 inhibition studies, *Bioorg Chem.* **102**, 104125.
- [144] **Taherian, E., Khodarahmi, G., Khajouei, M.R., Hassanzadeh, F. ve Dana, N.** (2019). Synthesis and cytotoxic evaluation of novel quinoxalinone derivatives with substituted benzimidazole in position 3, *Res Pharm Sci.* **14** (3), 247-254.
- [145] **Acar Cevik, U., Saglik, B.N., Osmaniye, D., Levent, S., Kaya Cavusoglu, B., Karaduman, A.B., Ozkay, Y. ve Kaplancikli, Z.A.** (2020). Synthesis and docking study of benzimidazole-triazolothiadiazine hybrids as aromatase inhibitors, *Arch Pharm (Weinheim).* **353** (5), e2000008.
- [146] **Atmaca, H., Ilhan, S., Batir, M.B., Pulat, C.C., Guner, A. ve Bektas, H.** (2020). Novel benzimidazole derivatives: Synthesis, in vitro cytotoxicity, apoptosis and cell cycle studies, *Chem Biol Interact.* **327**, 109163.
- [147] **Ajibadea, P.A., Andrewa, F.P., Fatokunb, A.A. ve Oluwalana, A.E.** (2021). Synthesis, characterization and in vitro screening for anticancer potential of Mn(II), Co(II), Cu(II), Zn(II), and Pt(II) methoxyphenyl dithiocarbamate complexes, *Journal of Molecular Structure.* **1230**.
- [148] **Çevik, U.A., Sağlık, B.N., Korkut, B., Özkay, Y. ve Iğın, S.** (2018). Antiproliferative, cytotoxic and apoptotic effects of new benzimidazole derivatives bearing hydrazone moiety, *Journal of Heterocyclic Chemistry.* **55**, 138-148.

- [149] **Wang, Y.T., Qin, Y.J., Yang, N., Zhang, Y.L., Liu, C.H. ve Zhu, H.L.** (2015). Synthesis, biological evaluation, and molecular docking studies of novel 1-benzene acyl-2-(1-methylindol-3-yl)-benzimidazole derivatives as potential tubulin polymerization inhibitors, *Eur J Med Chem.* **99**, 125-37.
- [150] **Krishnanjaneyulu, I.S., Saravanan, G., Vamsi, J., Supriya, P., Bhavana, J.U. ve Sunil Kumar, M.V.** (2014). Synthesis, characterization and antimicrobial activity of some novel benzimidazole derivatives, *J Adv Pharm Technol Res.* **5** (1), 21-7.
- [151] **Al-blewi, F.F., Almeahadi, M.A., Aouad, M.R., Bardaweel, S.K., Sahu, P.K., Messali, M., Rezki, N. ve El Ashry, E.H.** (2018). Design, synthesis, ADME prediction and pharmacological evaluation of novel benzimidazole-1,2,3-triazole-sulfonamide hybrids as antimicrobial and antiproliferative agents, *Chemistry Central Journal.* **12**.
- [152] **Kucukbay, H., Gunal, S., Orhan, E. ve Durmaz, R.** (2010). Synthesis and antimicrobial activities of some transition metal benzimidazole complexes, *Asian Journal of Chemistry.* **22**, 7376-7382.
- [153] **Chkirate, K., Karrouchi, K., Dege, N., Sebbar, N.K., Ejjoummany, A., Radi, S., Adarsh, N.N., Talbaoui, A., Ferbinteanu, M., Essassia, M. ve Garcia, Y.** (2020). Co(ii) and Zn(ii) pyrazolyl-benzimidazole complexes with remarkable antibacterial activity, *New Journal Of Chemistry.* **44**, 2210-2221.
- [154] **Dai, X., Wang, L., Deivasigamni, A., Looi, C.Y., Karthikeyan, C., Trivedi, P., Chinnathambi, A., Alharbi, S.A., Arfuso, F., Dharmarajan, A., Goh, B.C., Hui, K.M., Kumar, A.P., Mustafa, M.R. ve Sethi, G.** (2017). A novel benzimidazole derivative, MBIC inhibits tumor growth and promotes apoptosis via activation of ROS-dependent JNK signaling pathway in hepatocellular carcinoma, *Oncotarget.* **8** (8), 12831-12842.
- [155] **Noha, R.M., Abdelhameid, M.K., Ismail, M.M., Mohammed, M.R. ve Salwa, E.** (2020). Design, synthesis and screening of benzimidazole containing compounds with methoxylated aryl radicals as cytotoxic molecules on (HCT-116) colon cancer cells, *Eur J Med Chem.* 112870.
- [156] **Gao, C., Li, B., Zhang, B., Sun, Q., Li, L., Li, X., Chen, C., Tan, C., Liu, H. ve Jiang, Y.** (2015). Synthesis and biological evaluation of benzimidazole acridine derivatives as potential DNA-binding and apoptosis-inducing agents, *Bioorg Med Chem.* **23** (8), 1800-7.



- [157] **Liu, S., Cao, W., Yu, L., Zheng, W., Li, L., Fan, C. ve Chen, T.** (2013). Zinc(II) complexes containing bis-benzimidazole derivatives as a new class of apoptosis inducers that trigger DNA damage-mediated p53 phosphorylation in cancer cells, *Dalton Trans.* **42** (16), 5932-40.
- [158] **Ambika, S., Manojkumar, Y., Arunachalam, S., Gowdhami, B., Meenakshi Sundaram, K.K., Solomon, R.V., Venuvanalingam, P., Akbarsha, M.A. ve Sundararaman, M.** (2019). Biomolecular interaction, anti-cancer and anti-angiogenic properties of cobalt(III) schiff base complexes, *Sci Rep.* **9** (1), 2721.
- [159] **Ohno, Y., Yi, R., Suganami, A., Tamura, Y., Matsumoto, A., Matsumoto, S., Saito, K. ve Shirasawa, H.** (2021). CCL299, a benzimidazole derivative induces G1 phase arrest and apoptosis in cancer cells, *Anticancer Res.* **41** (2), 699-706.

## ÖZGEÇMİŞ

**Ad-Soyad** : Özgür YILMAZ

### ÖĞRENİM DURUMU:

**Lisans** :2005-İstanbul Üniversitesi / Fen Fakültesi / Biyoloji Bölümü

**Yüksek Lisans** :2012-İnönü Üniversitesi / Fen-Edebiyat Fakültesi / Biyoloji Bölümü / Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı

**Doktora** :2021-İnönü Üniversitesi / Fen-Edebiyat Fakültesi / Biyoloji Bölümü / Genel Biyoloji Ana Bilim Dalı

### SCI, SSCI, AHCI İNDEKSLERİNE GİREN DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER:

- Apohan E., Yılmaz U., Yılmaz O., Serindag A., Küçükbay H., Yesilada O. ve Baran Y.(2017). Synthesis, cytotoxic and antimicrobial activities of novel cobalt and zinc complexes of benzimidazole derivatives. *Journal of Organometallic Chemistry*, 828,52-58.

### DİĞER DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER:

- Keskin M., Karlıdag S., YılmazO., Tatlıcı E., Karabulut E., Apohan E. ve Yesilada O. (2020). Comparison of Biochemical, Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Different Propolis Samples from Malatya and Bilecik. *Rev. Chim*, 71 355-362

### HAKEMLİ KONFERANS/SEMPOZYUMLARIN BİLDİRİ KİTAPLARINDA YER ALAN YAYINLAR:

1. Geçkil H., Kurt A. G., Aytan E. ve Yılmaz Ö.(2012, Mart). Moleküler Yaşam Bilimlerinde Ph. D. Derecesi İçin Standartlar, İZMİR
2. Yılmaz Ö. ve Geçkil H. (2012, Eylül). *Vitreoscilla* hemoglobininin radyasyon dirençli *Deinococcus radiodurans*'ın büyüme ve çoğalma karakteristikleri üzerine etkisi, 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, İZMİR
3. Aytan E., Kurt A.G., Selçuk S., Yılmaz Ö., Özcan D. ve Geçkil H.(2012, Eylül). *Vitreoscilla* Hemoglobin Eksprasyonu Yapan Rekombinant *Erwinia herbicola*'da A Vitamini Üretimi, 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, İZMİR

4. **Apohan E., Ayfer S., Yılmaz Ö., Yılmaz Ü., Yeşilada Ö., Küçükbay H., Kaya E. ve Baran Y. (2015, Aralık).** Kronik Myeloid Lösemi Hücreleri Üzerine Yeni Benzimidazol Metal Kompleks Bileşiklerle İmatinibin Birlikte Sitotoksik Etkisi. 18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, KONYA.
5. **Yılmaz Ö., Özfer Y., Elif A., Küçükbay H. Ve Yılmaz Ü. (2019, June).**Yeni Sentezlenen Çinko Bağlı Metal Kompleksi Bileşiğın Sitotoksik ve Antimikrobiyal Aktivitesi, International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences, ANKARA, TURKEY.

#### **ULUSLARARASI YURTDIŞI KONFERANS/SEMPOZYUMLARIN BİLDİRİ KİTAPLARINDA YER ALAN YAYINLAR:**

**Apohan E., Yesilada O., Yilmaz O., Serindag A., Yilmaz U., Kucukbay H., Kaya E. ve Baran Y. (2015, September).** Cytotoxic Effect of Benzimidazole Metal Complex Compounds on Lung Cancer Cells (A549), 9th Biotechnology Congress, Orlando, Florida, USA.

#### **ÖDÜLLER:**

**Apohan E., Yılmaz Ü., Yılmaz Ö., Serindağ A., Yeşilada Ö., Hasan Küçükbay, Kaya E., Baran Y. ve Kiraz Y. (2017).** Yeni Benzimidazol Metal Kompleks Bileşiklerinin KML Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisi ". II. Uluslararası Katılımlı Deneysel Hematoloji Kongresi, Abdullah Gül Üniversitesi. KAYSERİ. ( En İyi Bildiri Ödülü)

#### **PATENT:**

- 2021/011336 numaralı ‘Antikanser ve Antimikrobiyal Etkili Çinko ve Kobalt Benzimidazol Kompleksleri’ konulu buluş için patent başvurusu.

#### **SUNUMLAR:**

- **Optogenetik** (Yüksek Lisans Semineri, 2012)
- **mTOR (Mammalian Target of Rapamycin) Sinyal Yolağı ve Kanser** (Doktora Semineri, 2014)
- **Kanser Hücrelerinin Aerobik Fermantasyon Tercihı; mTOR Sinyal Yolağının Rolü "** (Doktora Semineri, Ocak 2016)